



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

**AUTOMATIZOVANÉ PROCEDURY PRO KOHERENCÍ
ŘÍZENÝ HOLOGRAFICKÝ MIKROSKOP**

AUTOMATED PROCEDURES FOR COHERENCE CONTROLLED HOLOGRAPHIC MICROSCOPE

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Zbyněk Dostál

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

BRNO 2016

Abstrakt

Koherencí řízený holografický mikroskop (CCHM) a Fluorescenční holografický mikroskop (FHM) byly vyvinuty zejména pro kvantitativní fázové zobrazování a měření dynamiky živých buněk, které obvykle bývá je předmětem digitální holografické mikroskopie (DHM). CCHM a FHM v režimu nízké koherence rozšiřují možnosti digitální holografické mikroskopie pro studium živých buněk. Nicméně, výhoda plynoucí z využití nízké koherence je doprovázena zvýšenou citlivostí systému na přesnou justáž. Z tohoto důvodu je zavedení automatické justáže systému nevyhnutelné. V disertační práci je odvozena teorie řízení, je navržen a experimentálně ověřen automatizovaný systém justáže pro oba mikroskopy. Bylo zjištěno, že holografický signál je významnou veličinou pro provedení justážních postupů. Na tomto základě byly odvozeny původní procedury nastavení, které obsahují procesy pro počáteční a pokročilou justáž, jakož i pro dlouhodobé udržení mikroskopu v naladěném stavu. Automatizované procesy byly v obou mikroskopech implementovány pomocí původní sady robotických mechanismů. Všechny v práci popsány postupy byly experimentálně ověřeny na mikroskopech v laboratoři experimentální biofotoniky. Pro FHM byl navíc vyvinut ovládací software, který obsahuje potřebné automatizované procedury.

Summary

Coherence-Controlled Holographic Microscope (CCHM) and a Fluorescence Holographic Microscope (FHM) were developed particularly for quantitative phase imaging and measurement of live cell dynamics, which used to be a subject of digital holographic microscopy (DHM). CCHM and FHM in low-coherence mode extend capabilities of DHM in the study of living cells. However, this advantage following from the use of low coherence is accompanied by increased sensitivity of the system to its correct alignment. Therefore, the introduction of an automatic self-correcting system is inevitable. Accordingly, in the thesis, the theory of a suitable control system is derived and the design of an automated alignment system for both microscopes is proposed and experimentally proved. The holographic signal was identified as a significant variable for guiding the alignment procedures. On this basis the original basic realignment algorithms were proposed, which encompasses the processes for initial and advanced alignment as well as for long-term maintenance of the microscope aligned state. Automated procedures were implemented in both microscopes unique set of robotic mechanisms designed and built within the frame of the thesis work. All of the procedures described in the thesis were in real experimentally proved at real microscopes in the experimental biophotonics laboratory. In addition, the control software, which contains the needed automated procedures, was developed for FHM.

Klíčová slova

Světlo nízké koherence, interferometrie, holografický mikroskop, automatická justáž, robotické mechanismy, software.

Keywords

Low-coherent light, interferometry, holographic microscope, automated alignment, robotic mechanisms, software.

DOSTÁL, Z. *Automatizované procedury pro Koherenci řízený holografický mikroskop.*
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2016, 82 s., Vedoucí
prof. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně, pouze za odborného vedení prof. RNDr. Radima Chmelíka, Ph.D., a všechny podklady jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

.....

V Brně 27. června 2016.

Děkuji prof. RNDr. Radimu Chmelíkovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady. Také děkuji Ing. Pavlu Kolmanovi, Ph.D. a Ing. Lukáši Kvasnicovi, Ph.D. za rady a pomoc.

Obsah

1	Úvod a cíle disertační práce	3
2	Mikroskopie živé buňky	5
2.1	Optické vlastnosti živé buňky	5
2.2	Moderní metody zobrazování buněk	5
2.3	Klasické neinvazivní metody zobrazování živých buněk	8
2.4	Interferenční metody pro kvantitativní zobrazování buněk	9
3	Justáž optických mikroskopů	13
3.1	Justáž mikroskopů klasických zobrazovacích technik	13
3.2	Justáž mikroskopů moderních zobrazovacích technik	14
3.3	Justáž interferenčních mikroskopů	14
4	Optické sestavy mikroskopů a zpracování obrazu	17
4.1	Koherenci řízený holografický mikroskop	17
4.2	Fluorescenční holografický mikroskop	18
4.3	Zpracování obrazu	19
5	Teorie zobrazení pro CCHM a FHM	23
5.1	Teorie zobrazení pro CCHM	23
5.2	Teorie zobrazení pro FHM	25
5.3	Experimenty	26
6	Justážní procedury a jejich testování	33
6.1	Popis pohyblivých částí mikroskopů	33
6.2	Procedury úvodního nastavení mikroskopů	34
6.2.1	Prvá fáze úvodního nastavení	34
6.2.2	Druhá fáze úvodního nastavení	36
6.2.3	Testování procedur na CCHM mikroskopu	39
6.2.4	Testování procedur na FHM mikroskopu	39
6.3	Procedura pro dlouhodobé popzorování na CCHM mikroskopu	41
7	Konstrukce robotizovaných prvků	45
7.1	Robotizované prvky se servopohony	45
7.2	Robotizované prvky s lineárními stolky	55
8	Software pro řízení Fluorescenčního holografického mikroskopu	59
8.1	Program uživatelského rozhraní	59
8.2	Regulátor servopohonů	60
8.3	Regulátor lineárních stolků	63
8.4	Program kamery Basler	63
8.5	Program ke zpracování obrazu	64

9	Závěr	67
A	Alternativní veličina pro justáž mikroskopů	69
B	Metoda hodnocení ostrosti obrazu CCHM mikroskopu	71
B.1	Hardwarový autofokus pro mikroskopii	71
B.2	Softwarový autofokus	72
B.3	Experiment	73
B.4	Návrh metody softwarového autofokusu	73

1 Úvod a cíle disertační práce

Koherencí řízený holografický mikroskop a Fluorescenční holografický mikroskop, které byly naší výzkumnou skupinou vyvíjeny, kladly v minulosti nepřiměřeně vysoké nároky na uživatele, neboť vyžadovaly před každým měřením manuální nastavení mikroskopu s cílem dosáhnout nejvyššího kontrastu interferenčních proužků. Tato nevýhoda bránila širšímu uplatnění těchto mikroskopů na biologických pracovištích. Jedinou cestou, jak tuto nevýhodu odstranit byla **automatizace nejdůležitějších procesů**, které probíhají při spuštění a provozu holografických mikroskopů vyvíjených naší výzkumnou skupinou. Této problematice a tomuto cíli je věnována tato disertační práce. Jejímí dílčími cíli bylo:

- sestavit přehled používaných metod pro justáž mikroskopů,
- uvážit použitelnost současných justážních metod pro námi vyvíjené mikroskopy,
- navrhnout a ověřit veličinu vhodnou k charakterizaci naladění mikroskopů,
- navrhnout a otestovat vhodné justážní procedury,
- navrhnout a vyrobit počítačem řízené robotické mechanismy pro vyvíjené mikroskopy,
- vytvořit řídicí program pro právě vznikající Fluorescenční holografický mikroskop,
- do programu integrovat metody automatické justáže.

Vyjmenované úkoly byly postupně řešeny a jejich řešení se stalo podkladem jednotlivých kapitol této práce. V rešeršní části práce v kapitole 2 jsou shrnuty nejpoužívanější metody mikroskopie živé buňky včetně interferenčních metod. Pro tyto metody jsou v kapitole 3 uvedeny možnosti justáže mikroskopů. V literatuře publikované metody justáže pro interferenční (tedy i holografické) mikroskopy byly shledány nevyhovujícími pro mikroskopy, které naše výzkumná skupina vyvíjí (viz popis mikroskopů v kapitole 4). Tyto metody buď vyžadovaly přídavný osvit vzorku či doplnění optické sestavy mikroskopy o dodatečnou optiku. Proto byla v kapitole 5 odvozena a na mikroskopech otestována vhodná veličina využitelná pro hodnocení stavu naladění mikroskopů. Na základě jejího měření byly v kapitole 6 navrženy a otestovány vhodné justážní procedury. Z jejich požadavků vyplynulo v kapitole 7 konstrukční řešení robotizovaných mechanismů, které umožňují praktické zavedení justážních procedur. Poslední 8. kapitola je zaměřena na popis funkcí obslužného softwaru pro Fluorescenční holografický mikroskop, který byl speciálně vytvořen pro tento mikroskop. Tento software také obsahuje navržené justážní procedury. V dodatku práce je následně zhodnocena možnost použití alternativní veličiny pro justáž mikroskopů a návrh formy softwarového autofokusu pro Koherencí řízený holografický mikroskop.

2 Mikroskopie živé buňky

2.1 Optické vlastnosti živé buňky

Zobrazování buněčných preparátů pro biologické aplikace má oproti technickým aplikacím mikroskopie mnohá specifika a s nimi související požadavky na zobrazovací soustavu mikroskopu. Snad nejvýznačnějším z nich je vlastní optická povaha živé buňky, která je z největší části tvořena vodou, tedy látkou o přibližně stejném indexu lomu, jako má její přirozené prostředí. Buňka je z chemického hlediska membránami ohraničený vodný roztok především proteinů, lipidů, cukrů, jejichž hmotnost je označována jako *suchá hmota buňky* [1]. Tyto látky se od svého rozpouštědla liší indexem lomu, jsou amplitudově nekонтрастní a zároveň pro biology nejvíce zajímavé. Proto lze buňky řadit z optického hlediska mezi fázové objekty, tedy objekty, které mění zejména fázi procházející světelné vlny, nikoliv její amplitudu. Tudíž je problematické zobrazit živou buňku běžným světelným mikroskopem.

2.2 Moderní metody zobrazování buněk

Problém nízkého amplitudového kontrastu řeší moderní metody mikroskopie značením buněk fluorescenčními barvivy. První popisy fluorescenčních metod byly uveřejněny na začátku 19. století [2, 3]. Jejich společným principem je, že specifická část buňky je nabarvena fluorescenčním barvivem, tedy látkou s přesně definovaným excitačním a emisním spektrem [4]. Emisní spektrum je vůči excitačnímu posunuto Stokesovým posuvem do oblasti červené části spektra. Je tedy vyzařeno světlo o nižší energii, než mělo světlo excitační. Rozdíl energií je uvolněn při nezářivých přechodech ve fluorescenčním barvivu a mění se například na tepelnou energii. Díky tomuto posuvu je možno emitované světlo vyfiltrovat a oddělit jej od excitačního světla. Vlastní barvení lze provést dvěma způsoby. Podobně jako při klasickém barvení je buňka fixována. Tím je znemožněno studium životních procesů buňky. Druhou možností je buňku geneticky modifikovat transfekcí plasmidu, který způsobuje produkci barviva, které je specificky vázáno v buňce [5]. Tímto zásahem je však buňka nenávratně pozměněna.

Základní metodou pro fluorescenční pozorování buněk je epi-fluorescenční mikroskopie [6, 7]. Konstrukce mikroskopu vychází z principu běžného transmisního mikroskopu. Je doplněna druhou osvětlovací soustavou, která je vložena mezi objektiv a okulár nebo čip kamery. Tato soustava se skládá z širokopásmového zdroje (např. halogenová výbojka, systém LED), kolektorové čočky a výměníku s tzv. fluorescenčními kostkami, které jsou soustavou tvořenou excitačním filtrem, dichroickým zrcadlem a barierovým filtrem. Barvivo navázané na studované buněčné struktury je odrazem od dichroického zrcadla a po průchodu objektivem osvětleno vlnovými délkami excitačního spektra a tím dochází k jeho excitaci. Emitované záření je sbíráno objektivem, bez odrazu prochází dichroickým zrcadlem přes bariérový filtr. Ten propustí do okuláru (kamery) jen vlnové délky spektra emitovaného světla. Fluorescenční metoda je kvantitativní v tom smyslu, že podle jasů zaznamenaného obrazu lze určit množství svítícího barviva a tím i množství hmoty buňky,

na kterou je vázáno [8]. Nevýhodou fluorescence je omezená životnost fluorescenčního barviva, kdy po určitém počtu excitací a emisí barvivo bledne, vyhasíná a vyběluje se (photobleaching) vlivem nevratných změn v barvivu (štěpení kovalentních vazeb barviva) a vlivem nespecifikovaných reakcí mezi barvivem a ostatními molekulami [9]. Tomuto efektu lze předcházet snížením intenzity excitačního světla, časově omezeným osvětlením barviva, a zvýšením koncentrace barviva.

Princip epi-fluorescenčního pozorování je v dnešní době rozvíjen pro metody 3D zobrazování. Základní metodou je jeho kombinace s konfokální mikroskopií [10, 11] za vzniku laserové rastrovací konfokální mikroskopie [12]. Celé zorné pole objektivu je skenováno svazkem excitačního záření laseru pomocí vychylovacích zrcadel. Emisní a rozptýlené excitační záření, vycházející z předmětové roviny objektivu je po identickém průchodu optickou soustavou fokusováno do dírkové clony, za kterou dochází k filtraci. Světlo, rozptýlené mimo rovinu ostrosti, je cloněno. Obraz je opět tvořen pouze emitovaným světlem. Tímto způsobem je zobrazena bod po bodu pouze ta rovina vzorku, na kterou je objektiv zaostřen. K nasnímání 3D struktury vzorku je třeba mezi jednotlivými obrazy přeastřit do jiné hloubky vzorku a výsledných snímků počítačově vytvořit 3D zobrazení. Obdobně lze kombinovat epi-fluorescenční pozorování s vícekanálovou konfokální mikroskopií [13, 14], která využívá soustavy dvojic dírkových clon, které rotují na Nipkowově kotouči. Výsledkem je konfokální fluorescenční mikroskop, který vyžaduje pouze jedné rotace Nipkowova disku k tomu, aby nasnímal celé zorné pole objektivu. Podobně lze dosáhnout hloubkové diskriminace skenováním při požití vícefotonové fluorescenční mikroskopie [15], která se vyznačuje tím, že excitovaný stav barviva je vyvolán absorpcí více fotonů, jejichž celková odevzdaná energie je shodná jako při běžné absorpci jedním fotonem. Aby mohlo k takové absorpci dojít, musí být fluorescenční barvivo osvětleno s velkou intenzitou světla. Tento jev nastává pouze v rovině ostrosti objektivu.

Konfokální metody pozorování lze využít k měření vnitřní dynamiky živé buňky. Tato metoda se nazývá FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) [16]. Metoda byla původně vyvinuta pro příčné pozorování difúze molekul. Fluorescenční barvivo je navázáno na zkoumané proteiny, membránové lipidy apod. Po ozáření vybraného místa excitačním světlem je fluorescence molekul vysvícena. Lze pak pozorovat znovuoobnovení fluorescence ve vysvíceném místě, které svědčí například o příčném pohybu molekul, kontinuitě membránových organel, pohybu zkoumaných molekul nebo jejich transportu. Obdobnou metodou je metoda FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching). Touto technikou se zkoumá pohyb molekul uvnitř buněk a membrán. Metoda využívá cíleného vybělování barviva. Je definována měřená oblast zájmu a kontrolní oblast. Ta slouží k určení velikosti fluorescenčního signálu před započítáním vybělování. Oblast zájmu je vybělována intenzivním laserovým zábleskem. Poté je nezbytné vyčkat ustálení a obnovy fluorescence ve vybělené oblasti buňky. Tyto kroky jsou cyklicky opakovány. Změna fluorescence v oblasti zájmu je pak kvantifikována [17]. Dále je možno zkoumat interakce molekul metodou FRET (Förster Resonance Energy Transfer) [18]. FRET umožňuje studovat interakce mezi proteiny, interakce protein-DNA a strukturní změny proteinů. Molekuly jsou označeny odlišnými barvivy, která jsou zvolena tak, aby se emisní spektrum jednoho z nich překrývalo s excitačním spektrem druhého. Pokud tyto molekuly vzájemně reagují a je-

jich barviva se dostanou velice blízko (méně než na 4 nm), energie excitovaného světla se může přenést z jednoho barviva na druhé. Získat kvantitativní FRET informaci z jednoho obrázku je složité, protože fluorescenční intenzita nezávisí jenom na účinnosti přenosu, ale i na neznámé koncentraci barviva. Proto se provádí až 8 měření s různými kombinacemi barviv a tedy s různými excitačními a emisními vlnovými délkami.

Metody, které byly v této kapitole zatím popsány spojuje jedna vlastnost. Tou je omezení příčného rozlišení dané Abbeho podmínkou [19]. Obecněji řečeno dvourozměrnou přenosovou funkcí bodu (2D PSF), která je dána použitou optikou. V případě konfokálního zobrazení se pak mluví o třírozměrné přenosové funkci bodu (3D PSF). Nicméně existují metody, které dokáží zmenšit velikost 3D PSF a tím zvýšit rozlišení přístroje. Jedná se například o metodu STED (Stimulated Emission Depletion Microscope) [20]. Ta, jak je zmíněno v názvu, využívá principu stimulované emise. Excitační laserové světlo excituje barvivo vzorku shodně jako při konfokálním zobrazení a velikost 3D PSF je neměnná a daná volbou optiky mikroskopu. Aby byla snížena její velikost, zavádí se do optické soustavy druhý osvětlující svazek (depleční svazek), vyvolávající stimulovanou emisi fluorescenčního barviva a tím je potlačena jeho fluorescence. 3D PSF tohoto svazku je tvarována tak, aby kolem 3D PSF excitačního svazku vytvářela slupku a tím zmenšovala oblast, ze které je emitováno fluorescenční záření. Parametry a intenzitu 3D PSF deplečního svazku lze upravovat. Tímto způsobem je možno dosáhnout rozlišení 50 – 200 nm. Světlo excitačního a deplečního svazku je filtrováno a nepodílí se na zobrazení vzorku. Pro další zvýšení rozlišení je metoda dále vyvíjena a nahrazována metodou Gated STED, která využívá časování sběru emitovaného záření v průběhu životnosti excitovaného stavu fluorescenčního barviva [21].

Další možností, jak získat vysoké rozlišení na úrovni molekul, je použití foto-spínaných barviv a metod STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM (Photo-activated Localization Microscopy) nebo FPALM (Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy) [22]. Jedná se o barviva, která je možné přepínat pomocí laseru nízkého výkonu z nefluorescenčního do fluorescenčního stavu a zpět. Po osvitu tímto laserem má jakákoliv molekula barviva malou pravděpodobnost, že je přepnuta do fluorescenčního stavu. Zbytek populace zůstává v původním nefluorescenčním stavu. Rozdíl mezi těmito metodami je dán povahou fluorescenčního barviva, které metody využívají. Základním principem STORM, PALM, FPALM a dalších souvisejících metod je, že aktivovaný stav fotospínatelného barviva musí vést při po sobě jdoucích emisích fotonů k tomu, aby byla možná přesná lokalizace barviva před tím, než je barvivo přepnuto do nefluorescenčního stavu nebo vyběleno. Navíc řídce aktivované fluorescenční molekuly musí být od sebe vzdáleny více než je příčné rozlišení dané Abbeho podmínkou, aby bylo možno přesně určit polohu svítícího barviva.

Další rozšířenou technikou je metoda SIM (Structure Illumination Microscopy), která bývá kombinována s metodou osvětlení TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) [23]. Metoda SIM využívá vzor mříže, která je promítána do roviny ostrosti objektivu. Vzorek mříže je za stálého snímkování posouván a tento proces je opakován pro celkem šest úhlů jejího natočení. Výsledný obraz je pomocí Fourierovských metod skládán v prostorově frekvenční oblasti. Rozlišení výsledného obrazu odpovídá použití objektivu s dvoj-

násobnou numerickou aperturou. Jedná se o metodu světlého pole, tudíž výsledný obraz postrádá informaci o hloubce, z které je snímán. Tato metoda je často kombinována s metodou TIRF. Tato metoda je vhodná pro pozorování oblastí buňky které jsou v těsné blízkosti podložního skla. Vzorek je osvětlen ze strany objektivu tak, že na optickém rozhraní buňka-sklo dochází k totálnímu odrazu. Vzniklá evanescentní vlna se šíří na stranu buňky a excituje fluorescenční barvivo. Společnou nevýhodou všech metod založených na fluorescenci světla je jejich invazivita. Při pozorování živé buňky fluorescenčními metodami je chování buňky ovlivňováno fototoxicitou fluorescenčních barviv [24].

2.3 Klasické neinvazivní metody zobrazování živých buněk

Jde o metody, které jsou schopny vizualizovat změny fáze vlny a nevyžadují tedy žádné umělé značení buňky. Historicky nejstarší je metoda Zernikova fázového kontrastu [25, 26], která je založena na interferenci světla rozptýleného vzorkem, a světla, které prochází vzorkem bez rozptylu a je uměle fázově posunuto. Vzorek je osvětlen pomocí kondenzoru, v jehož přední ohniskové rovině je vložena clona ve formě propustného mezikruží. Pokud nedojde k rozptylu světla vzorkem, prochází toto světlo do objektivu, v jehož zadní ohniskové rovině je vložena fázová maska ve formě mezikruží, které posouvá fázi tohoto světla o $\pi/2$ nebo $-\pi/2$ podle toho, zda se jedná o pozitivní či negativní fázový kontrast. Světlo vzorkem rozptýlené prochází mimo toto mezikruží. Interferencí obou složek světelné vlny je navozen kontrast fázových objektů, který ovšem neumožňuje stanovit fázové posuvy světla ve vzorku kvantitativně. Výsledný fázový obraz je navíc zatížen nežádoucím artefaktem ve formě halo-efektu v místech velkých fázových skoků, tedy například na okraji buňky, který znemožňuje pozdější přesné určení její hranice. Obdobnou metodou je i Nomarského diferenciální interferenční kontrast [27], který využívá principu polarizace a interference. Svazek je před vstupem do kondenzoru polarizován a rozdělen Nomarského hranolem do dvou kolmo polarizovaných svazků, které jsou vůči sobě nepatrně příčně posunuty. Po průchodu vzorkem a objektivem jsou svazky pomocí druhého Nomarského hranolu sloučeny zpět. Vzniklý svazek prochází analyzátozem a vytváří obraz, jehož body charakterizují dráhový rozdíl příčně posunutých paprsků. Obraz vyvolává dojem šikmého nasvícení vzorku. Další méně používanou metodou je Hoffmanův modulační kontrast [28], která využívá principu šikmého osvětlení. V přední ohniskové rovině kondenzoru je mimosově umístěna obdélníková štěrbin. V místě jejího obrazu, v zadní ohniskové rovině objektivu, je umístěn modulátor tvořený amplitudovou maskou, která je dělena na tři části. Část masky je zcela absorbující, další část je propustná. Mezi nimi je oblast, která propouští 15 % intenzity světla. Světlo ze štěrbin kondenzoru, které prochází oblastí vzorku s gradientem optické tloušťky, se odchýlí od původního směru a obraz štěrbin vytvořený v zadní ohniskové rovině objektivu je posunut vzhledem k zóně modulátoru s 15 % absorbancí. Tak dopadá na zcela absorbující nebo zcela propustnou plochu. Tím dochází ke ztemnění nebo zjasnění příslušného místa v obraze vzorku. Výsledek budí dojem šikmo osvětleného reliéfu a je velmi podobný Nomarského kontrastu. Vzhled obrazu závisí na orientaci gradientu optické tloušťky objektu vzhledem ke štěrbině. Rovnoběžné gradienty se neprojeví. Tato metoda je levnější než předešlá metoda, protože nevyžaduje polari-

zované světlo a lze pozorovat i objekty na dvojlovných podložkách (plastikové misky). Společným rysem všech těchto metod je, že výsledný fázový obraz není kvantitativní a pouze vizualizuje buňku. Tudíž neumožňují měření suché hmoty v buňce, jejíž plošná hustota je přibližně úměrná fázovému posuvu světelného svazku v příslušném bodě vzorku [1].

2.4 Interferenční metody pro kvantitativní zobrazování buněk

V předchozí části práce jsou popsány metody, které jsou běžně používány v biologických laboratořích a při výzkumu živých buněk. Avšak žádná z popsanych metod neumožňuje zobrazovat živou buňku neinvazivně bez zásahu do jejího přirozeného stavu, a současně kvantitativně ve smyslu určení množství či rozložení hmoty buňky. Jak již bylo řečeno, je známo, že plošná hustota suché hmoty buňky je přibližně úměrná fázovému posuvu světla v daném bodě vzorku [1]. Neinvazivní a současně kvantitativní pozorování živých buněk tedy umožňují metody kvantitativního fázového zobrazování (Quantitative Phase Imaging - QPI), z nichž nejvíce je zastoupena metoda digitální holografické mikroskopie (DHM). Holografické metody mikroskopie tedy v jistém smyslu představují neinvazivní protějšek fluorescenčních metod.

Název „holografie“ (z řeckého holos - úplný a grafie - záznam) napovídá, že se jedná o metodu určenou k plnému záznamu světelné vlny. Oproti klasické fotografii, kde je zachycena intenzita světla, holografický snímek zaznamená vlnu jako celek, tedy jak amplitudu vlny, tak i její fázi. Takto vzniká kvantitativní fázové obrazení (QPI), které je vhodné k pozorování měření dynamiky živých buněk [29]. Vlnu z interferenčního záznamu jako první zrekonstruoval poprvé v čtyřicátých letech minulého století Gabor [30] při experimentu s in-line uspořádáním interferometru, jenž byl založen na interferenci elektro nového záření rozptýleného objektem (předmětová vlna) a záření nerozptýleného (referenční vlna). Tato metoda byla rozvíjena pro použití v biologických aplikacích s použitím laserového světla [31]. In-line uspořádání využívají prakticky všechny interferenční mikroskopy. Zaznamenaný interferogram však není hologramem v pravém slova smyslu, neboť neumožňuje jednoznačnou rekonstrukci fáze. Pro získání kompletní fázové informace nutno využít Phase Shifting Algoritmu [32]. Metod pro záznam a rekonstrukci je několik, liší se počtem interferogramů, které je třeba zaznamenat a diferencí rozdílu dob šíření - při menším počtu záznamů musí být velikost difference mezi jednotlivými interferogramy známá a přesně nastavená hodnota (chyba nastavení negativně ovlivňuje přesnost získané informace - zejména fáze), při větším počtu záznamů není nutné dodržet přesnou hodnotu difference mezi jednotlivými interferogramy. Příkladem zařízení, které bylo upraveno pro kvantitativní fázové pozorování je interferenční Hornův mikroskop [33, 34]. Metoda řízené fáze byla aplikována i při adaptaci Zernikovy metody fázového kontrastu na metodu kvantitativního fázového zobrazování (SLIM [35]). Oproti Gaborovu uspořádání využívají obě metody plošný polychromatický zdroj osvětlení. Oba mikroskopy jsou vybaveny achromatickým posouvačem geometrické fáze. U Hornova přístroje je tento prvek tvořen trojicí hranolů, přičemž prostřední je umístěn na motorizovaném posuvu tak, aby mohl být zasouván mezi zbylé dva hranoly. SLIM mikroskop má v rovině, která je opticky

sdružena se zadní ohniskovou rovinou, vložen prostorový modulátor světla, který svojí funkcí mění fázové zpoždění referenční vlny (světla nerozptýleného vzorkem). Z důvodu nízké koherence světla plošného polychromatického zdroje je vyžadováno, aby referenční a předmětová vlna procházela opticky identickou cestou.

S příchodem off-axis holografie [36] bylo možno provést kompletní záznam vlny jedním iterferogramem - hologramem, což v mikroskopových aplikacích umožnilo zvýšit frekvenci snímání při sledování dynamiky živých buněk. Off-axis uspořádání znamená, že optické osy větví vůči sobě svírají úhel potřebný pro vytvoření sady interferenčních proužků, ze kterých lze rekonstruovat jednoznačně amplitudu a fázi zaznamenané vlny. Historicky první off-axis holografický mikroskop dovozoval pouze rekonstrukci vlny [37]. K rekonstrukci fáze vlny je třeba využít počítač, proto až s vývojem výkonného hardwaru vznikl první použitelný mikroskop [38]. Ten využívá laserový zdroj světla, který jako v klasickém transmisním mikroskopu osvětluje přes kondenzor vzorek. Obraz vzorku je zachytáván objektivem a kamerou. K vytvoření Mach-Zehnderova interferometru je paralelně k předmětové větvi vedena větev referenční, kterou díky vysoké koherenci zdroje není třeba osazovat shodnou optikou jako u Hornova mikroskopu. Off-axis holografický záznam lze také získat připojením modulu τ interferometru [39] nebo wDPM modulu [40] k běžnému mikroskopu. Světelná vlna vstupující do těchto modulů je dělena do dvou větví, přičemž v referenční větvi je vložen prostorový filtr, propouštějící pouze nultou prostorovou frekvenci. Nevýhodou všech popsaných off-axis uspořádání je použitý laserový zdroj. Zaznamenaný hologram je ovlivněn koherenčním šumem a záznamy difrakcí vznikajících na aperturách čoček. Tyto vady hologram poškozuji a zhoršují kvalitu výsledného fázového kontrastu.

Řešením problému je použití světla nízké časové a prostorové koherence (plošného polychromatického zdroje osvětlení). Tyto mikroskopy (Koherencí řízené holografické mikroskopy - CCHM) využívají principu nekoherentní off-axis holografie, založené na využití difrakční mřížky jako součásti interferometru. Interferenční struktura je tedy současně zobrazením struktury difrakční mřížky a proto ji lze vytvořit i nekoherentním světlem [41, 42, 43]. Nevýhoda těchto mikroskopů je stejná jako u Hornova mikroskopu, a to je nutnost opticky identických větví interferometru. Použití nekoherentního světla navíc zvyšuje náročnost nastavení mikroskopu, neboť čím méně koherentní světlo je použito, tím obtížnější je kvůli vysoké citlivosti nastavení optické délky obou větví a jejich přesné koincidence v příčném směru.

Kromě odstranění koherenčního šumu je další výhodou CCHM možnost využít efekt koherenční brány daný nízkou koherencí světla k tvorbě optických řezů vzorkem [44] (v reflexním módu) nebo k zobrazení v turbidním médiu [45, 46, 47] (v transmisním módu). Nízká koherence také zvyšuje stranové rozlišení a zobrazení jako takové [48]. Koherencí řízený holografický mikroskop [43] je vhodný k multimodálnímu zobrazování, například v kombinaci s epi-fluorescencí. Nicméně nedovoluje v tomto módu hloubkově diskriminované zobrazení fluorescenčního barviva. Toho lze dosáhnout využitím nekoherentní holografie, kdy je emitované záření snímáno objektivem z obou stran vzorku a to následně interferuje ve výstupní rovině mikroskopu [49, 50]. Tyto mikroskopy se vyznačují in-line uspořádáním interferometru, jsou achromatické a zdrojem záření může být polyc-

hromatický zdroj. Hlavní nevýhodou těchto zařízení je, že pro získání úplné informace o předmětové vlně (amplitudy a fáze) je nutno opět zaznamenat množství interferogramů (alespoň tři) lišících se rozdílem dob šíření emitovaného záření v první a v druhé větvi. Sestava mikroskopu dle [49] využívá pouze jeden detektor, takže je možné snímat pouze v časové posloupnosti, což prakticky omezuje použití takového zařízení na statické objekty. Systém uvedený v patentovém dokumentu [50] využívá kombinačního členu (děliče), který rozdělí svazky z první a z druhé větve a přivede je současně k několika detektorům. Kombinační člen zajistí časově neměnnou diferenci rozdílu dob šíření emitovaného záření v první a v druhé větvi, různou pro různé detektory. Všechny detektory mohou snímat synchronně, což vede ke zvýšení přesnosti měření vůči [49]. V současné době je vyvíjen a patentován Fluorescenční holografický mikroskop (FHM) [51], využívající podobného principu zobrazování, ale v kombinaci s off-axis holografickým uspořádáním interferometru. Předností tohoto mikroskopu je možnost tvorby optických řezů (obraz amplitudy). Z fáze se zdá být možné dopočítat rozložení indexu lomu preparátu v jeho 3D struktuře. CCHM a FHM mikroskopy vyžadují pro svou činnost a jednoduchou obsluhu robotické řízení vybraných prvků mikroskopu. Jedná se o komponenty určené k justáži přístroje, manipulaci se vzorkem, výměně fluorescenčních kanálů a řízení výsledného zvětšení mikroskopu. Bližšímu popisu těchto přístrojů, zpracování obrazu, řízení komponent a automatickým procedurám pro tyto přístroje se bude věnovat zbytek této práce.

3 Justáž optických mikroskopů

Optické mikroskopy jsou účinnými nástroji nejen v buněčné biologii, ale téměř ve všech oborech živých i neživých věd. Ať se jedná o ten nejjednodušší systém, nebo vysoce komplikovaný superrozlišovací systém, oba spojuje jedna důležitá věc. Tou je správné vyladění vzájemných poloh optických prvků, nebo li justáž. Pokud není přístroj správně seřízen, tak získaná obrazová data nejsou kvalitní. V lepším případě je sníženo rozlišení mikroskopu, jas obrazového pole není rovnoměrný, obraz není ostrý v celém zorném poli, je deformovaný. V tom nejhorším případě nedochází ke kýženému zobrazení. Proto každý výrobce mikroskopů dbá na jejich justovatelnost a postupy justáže bývají uvedeny v manuálech přístrojů.

3.1 Justáž mikroskopů klasických zobrazovacích technik

Tyto metody jsou přehledně shrnuty v [52]. Základem kvalitního zobrazení vzorku je jeho rovnoměrný osvit. Z historického hlediska jsou možné dva přístupy. Prvým z nich je použití „kritického osvětlení“, kdy je do pozorované roviny vzorku zobrazen přímo zdroj světla. Tímto zdrojem bývalo pro první mikroskopy Slunce či plamen svíčky. Těsně za zdrojem světla je v optické cestě polní clona, která ovlivňuje velikost vysvíceného zorného pole. V zadní ohniskové rovině kondenzoru je vložena aperturní clona, která mění aperturu osvětlení zorného pole. Je důležité, aby tyto prvky byly středitelné. Při justáži tohoto osvětlení je polní clona téměř uzavřena tak, aby bylo zajištěno zobrazení její hrany. Obraz je pak pohybem kondenzoru zaostřen do roviny vzorku. Osová poloha aperturní clony je dána polohou ohniskové roviny kondenzoru. Clona by do ní měla být co nejpřesněji umístěna a také vystředěna. Její středění lze hodnotit například vůči pupile mikroskopového objektivu, se kterou by měla být soustředná. Pozorování lze provést například vřazením Bertrandovy čočky místo okuláru. V současnosti bývá tento princip osvětlení používán s homogenizovanými zdroji světla pomocí difuzérů a vlnodů. Namátkou například u jednoduchých mikroskopů světlého pole (MIC-D mikroskop firmy Olympus [53]) či fluorescenčních mikroskopů [54]. Druhou metodou je v dnešní době snad nejrozšířenější Köhlerovo osvětlení [55]. Tento osvětlovač se liší od předešlého přidáním kolektorové čočky. Ta zdroj světla zobrazuje do zadní ohniskové roviny kondenzoru - do roviny aperturní clony. Poloha polní clony je stejná. Princip justáže je obdobný. Přibývá jen nutnost ostření a středění kolektoru. Podle jednotlivých konstrukcí přístrojů se mírně liší možnosti, kterými prvky lze v osvětlovací části mikroskopu pohybovat. Je to z důvodu jejich plánovaného použití, ceny a kvality přístroje. Pro oba principy osvětlení je ale nutné, aby justážní prvky zajistily správnou funkci osvětlovače. U fluorescenčních mikroskopů zpravidla přibývá možnost justovat polohu výboje lampy. U klasických výbojkových zdrojů lze justovat čtyři prvky. Jde o centrování vlastního výboje, osovou polohu a pozici odrazné paraboly, a také defokusaci výboje v rovině vzorku.

Máme-li vzorek rovnoměrně osvětlen, je dán předpoklad kvalitního zobrazení. V moderních mikroskopech je zobrazovací část mikroskopu složena z objektivu a tubusové čočky. Ty musí společně vykreslit obraz vzorku, který okulár zvětšuje a zobrazuje jej tak,

aby lidské oko bylo schopno zobrazit všechny pozorované detaily vzorku. I přes rozdíly jednotlivých konstrukcí různých výrobců mikroskopů je nutno zajistit, aby zobrazovací optika byla co nejlépe vycentrována. Každá metoda klasické mikroskopie přináší nový požadavek na optickou soustavu. Například u Zernikeho fázového kontrastu se jedná o nutnost vystředit mezikruží kondenzorové masky vůči fázové destičce objektivu. Pro Nomarského fázový kontrast jsou to vzájemné pozice polarizačních hranolů. Pro Hoffmanův modulační kontrast je to poloha masky v ohniskové rovině kondenzoru. A tak dále. U těchto metod se dá už pouhým okem při pohledu na výsledný obraz posoudit kvalitu obrazových dat.

3.2 Justáž mikroskopů moderních zobrazovacích technik

K posouzení výsledného obrazu většiny těchto technik je již zapotřebí počítačová analýza zachyceného obrazu. Často jsou v mikroskopech kombinovány metody základní a metody moderních zobrazovacích technik. Proto jsou justážní postupy obdobné jako u klasických metod. Přinejmenším z toho důvodu, že klasické metody snadno dovolují nalezení obrazu vzorku a jeho ostré zobrazení. Přidané optické možnosti zobrazení moderních metod jdou ruku v ruce s použitím speciálních modulů připojených do klasického mikroskopu. Přípojným bodem bývá prostor mezi objektivem a tubusovou čočkou s tím, že vzorek je osvětlen přes objektiv. Justážní postupy těchto modulů jsou různé. Každý modul zpravidla obsahuje svůj vlastní zdroj světla (koherentní či nekoherentní), vlastní osvětlovací optiku na principech již popsanych a speciální optický prvek umístěný buď v rovině konjugované s rovinou vzorku (Nipkowův disk, systém galvozrcadel, amplitudové mřížky či jiné masky) nebo v rovině konjugované se zadní ohniskovou rovinou objektivu tak, aby ovlivňovaly fázi osvětlující vlny (fázové masky pro tvorbu speciálních svazků). Justáž těchto prvků je klíčová pro správnou funkci zobrazovacích technik. Například u metod konfokální mikroskopie a technik od ní odvozených je nutno svazek vystupující z dírkové clony či dírký Nipkowova kotouče precizně fokusovat do roviny ostrosti objektivu a pak jej zase vést zpět do dírkové clony či sdružené dírký kotouče. K tomu je nutno opět centrovat optiku, precizně nastavovat zrcátka a mít možnost ostření. U metody STED je klíčové sesadit stopy excitačního a deplečního svazku laserů a to jak příčně tak i osově [56].

3.3 Justáž interferenčních mikroskopů

Interferenční mikroskopové systémy nejsou v dnešní době příliš komerčně rozšířenými přístroji a téměř každý typ přístroje je unikátní. Nicméně u všech typů přístrojů platí, že jejich správná funkce a kvalitní záznam jsou závislé na kvalitě získané interference, tedy kontrastu interferenční struktury. Všechny dvoucestné systémy obsahují zobrazovací větev řešenou stejně jako u klasických mikroskopů. Ty systémy, které jsou založeny na interferenci světla laseru, se ladí lépe, protože použité světlo je vysoce časově i prostorově koherentní. Použití osvětlení nízké koherence vyžaduje velmi precizní justáž, která navíc musí zaručit časovou stabilitu mikroskopu během dlouhodobých biologických experimentů. Obě větve interferometru musí být při tom opticky ekvivalentní. Je-li použita jednocestná kons-

trukce jako u SLIM mikroskopu, jsou obě větve při dobrém vystředění všech optických elementů neustále ekvivalentní a interferenční struktura vzniká bez justážních zásahů. Oproti tomu u π interferometru nebo u Hornova mikroskopu [34] je nutno mikroskop pro dosažení kvalitní interference ladit. Například postupnou justáží obou větví Hornova mikroskopu naladit interferenci na nekonečnou šířku proužku. Toto ladění provádí uživatel vždy při vložení vzorku. V dnešní době je však možno pro justáž interferenčních systémů využít několik automatických metod.

Jedna z možností, jak naladit interferometr využívající zdroj bílého světla, je popsána v [57]. Sestava přístroje je založena na principu Michelsonova interferometru, do kterého je za zkoumaný vzorek zavedeno laserové světlo, které ve výstupní rovině spektrometru vytvoří interferenční strukturu. Detektor je složen z vlastního fotodetektoru přístroje, který není citlivý na laserové světlo, a ze čtyř do čtverce rozmístěných fototranzistorů, které jsou citlivé jen na světlo laseru. Justážní procedura spočívá za prvé v měření signálu fototranzistorů, který je závislý na rozdílu v naklonění zrcadel interferometru, a za druhé v měření fázových rozdílů signálů fototranzistorů. Pokud jsou zrcadla přesně sladěna, tak optické dráhové rozdíly pro všechny fototranzistory se budou rovnat a jejich signály budou ve fázi. Další metoda je schematicky podobná a je popsána v [58], kde se pomocí přídavného zdroje světla udržuje sjustovaný Michelsonův a Fabry-Perotův interferometr. Princip je založen na poměrování světelného výkonu mezi referenčním detektorem, který je osvětlen laserem přímo, a mezi světelnými výkony tří pomocných svazků, které jsou vedeny celým interferometrem kolem signálního svazku. Komparační elektronikou jsou regulovány servopohony, které ovládají náklon jednoho ze zrcadel. V [59] popsaná metoda je aplikována na Michelsonově interferometru a vychází z použití diferenciální fázové modulace tak, aby na výstupu interferometru umožnila detekci fázového rozdílu mezi dvěma gaussovskými svazky. K měření je použita jedna fotodioda nebo několik segmentových fotodiod umožňujících odvodit nepřesnost v překrytí vlnoploch na výstupu interferometru. Další systém využívající sekundární laserový zdroj ke stabilizaci interferometru je popsán v [60]. Interferometr je založen na Michelson–Linnikově principu a jako zdroj světla je použita superluminiscenční dioda. Signál sekundárního zdroje je snímán fotodiodou a je převáděn na velikost výchylky piezostolku s referenčním zrcadlem. Metody [60, 57, 61, 59] jsou nevhodné pro biologické zobrazování živých buněk, protože přídavný zdroj světla může na buňky působit destruktivně, nebo přinejmenším ovlivňovat jejich chování. Nevýhoda metody [58] spočívá v tom, že přidává dodatečně optické elementy do sestavy interferometru, což není praktické.

Metody popsané v předchozím textu tedy nejsou v tomto případě dobře použitelné. Mají-li se mikroskopy vznikající na našem pracovišti používat širokou základnou uživatelů, je proto nutné vyvinout vlastní automatickou metodu pro justáž. Budeme požadovat, aby tato metoda byla založena na optickém schématu přístroje. Veličina, která popisuje kvalitu zobrazení mikroskopu, nechť je odvozena přímo z holografického signálu, takže její hodnotu lze získávat téměř v reálném čase. Vhodnou veličinou, jak bude v práci dále ukázáno, je měřený holografický signál \bar{w}_D .

4 Optické sestavy mikroskopů a zpracování obrazu

4.1 Koherencí řízený holografický mikroskop

Optická sestava koherencí řízeného holografického mikroskopu (CCHM) [43, 62], na jehož návrhu a stavbě jsem se aktivně podílel, je zobrazena na obrázku 1(a). Jako zdroj světla je použita halogenová lampa, jejíž světlo je vedeno světlovodem do roviny zdroje Zd. Tato rovina je zobrazena kolektorovou čočkou Kol do zadních ohniskových rovin kondenzorů $K_{1,2}$ tak, aby vzorek VZ a referenční objekt RO byly osvětleny köhlerovsky. Světelný svazek je pomocí děliče D_1 a zrcadel $Z_{1,4,5}$ rozdělen do dvou optických cest objektové a referenční větve. Plynule měnitelná aperturní clona AC je umístěna v blízkosti zdroje světla Zd a dovoluje řídit prostorovou koherenci světla. Koherenci časovou ovlivňuje pásmový interferenční filtr IF. Polní rovina PR obsahující záměrný obrazec SC je kolektorem Kol a kondenzory K zobrazena do roviny vzorku VZ a referenčního objektu RO. Roviny vzorku i referenčního objektu jsou zobrazeny do roviny meziobrazů $MO_{1,2}$ pomocí mikroskopových objektivů $O_{1,2}$ a tubusových čoček $TČ_{1,2}$. Tyto roviny jsou zobrazeny do výstupní roviny interferometru VR pomocí výstupních objektivů $VO_{1,2}$. Hologram je zaznamenáván pomocí CCD kamery K, která je umístěna v těsné blízkosti výstupní roviny interferometru VR. Difrakční mřížka DM a zrcátko Z_2 jsou umístěny v rovinách vzniklých meziobrazů $MO_{1,2}$ za tubusovými čočkami $TČ_{1,2}$. Tím je ve výstupní rovině VR zaručen vznik interferenčního obrazce se shodnou prostorovou frekvencí proužků (nebo-li nosnou frekvencí f_c) pro všechny vlnové délky použitého světla a pro všechny body plošného zdroje Zd [43]. Principiálně optický systém tvoří off-axis holografické uspořádání, které je založeno na interferenci nultého a prvního difrakčního řádu. Achromatičnost a prostorová invariance interferenčního obrazce je dána faktem, že se prakticky jedná o Leithův princip zobrazení [63] difrakční mřížky do výstupní roviny interferometru VR pomocí výstupních objektivů VO. Mikroskop je vhodný k zobrazování z různých hloubek vzorku podle míry koherence použitého osvětlení. Je-li použito vysoce koherentní osvětlení, je možno provést plné numerické přeostrění. Použitím částečně koherentního osvětlení je pak možnost numericky osově přeostrit omezena [64, 65]. Na druhou stranu nízko-koherentní osvětlení vede (v širším slova smyslu) k tvorbě optických řezů [64]. Jejich tloušťka je závislá na hloubce ostrosti použitých mikroskopových objektivů [47]. Pak je přeostrění mimo optický řez možné jen opticky. Tento zobrazovací mód je vhodný například pro pozorování přisedlých buněk na spodním sklíčku pozorovací komůrky.

Vývoj mikroskopu pokračoval myšlenkou na zjednodušení optické sestavy náhradou kondenzoru a objektivu v referenční větvi variabilní optickou soustavou. Příslušné optické schéma již bylo námi patentováno [66], z časových důvodů však zatím nebylo realizováno. Příklad provedení interferometrického systému s variabilní optikou pro nekoherentní zdroj záření je schematicky znázorněn na obrázku 1(b) - (e). Předmětová a referenční větev obsahují obdobné optické prvky jako předchozí uspořádání CCHM s tím, že některé prvky jsou vypuštěny a prvky referenční větve mohou mít proměnlivé ohniskové vzdálenosti. Předmětová větev, tak jako v původním návrhu, obsahuje vstupní zobrazovací soustavu (kondenzor K pro Köhlerovo osvětlení vzorku, objektiv O a tubusová čočka TČ) a výstupní

zobrazovací soustavu VO. Interferometr pak musí splňovat jednu z těchto možností:

- Optická sestava na obrázku 1(b): Mikroskopový objektiv O_1 referenční zobrazovací soustavy a mikroskopový objektiv O_2 předmětové vstupní zobrazovací soustavy se od sebe liší, a to alespoň jedním z parametrů zahrnujících jmenovitou ohniskovou vzdálenost a jmenovitou numerickou aperturu. Z uvedeného vyplývá požadavek, aby zvětšení výstupních objektivů $VO_{1,2,(3)}$ kompenzovalo rozdílnost zvětšení mikroskopových objektivů $O_{1,2}$ tak, aby bylo zvětšení mezi polní rovinou PR a výstupní rovinou interferometru VR obou větví shodné. Soustava výstupních objektivů VO může být tvořena jednou soustavou pro každou větev nebo dělenou na dvě části s tím, že jedna část je společná pro obě větve a mezi tyto části výstupních soustav jsou vloženy soustavy zrcadel.
- Optická sestava na obrázku 1(c): Soustava interferometru je analogií předešlého bodu s tím rozdílem, že referenční zobrazovací soustava (K_1 , O_1 , $TČ_1$) je vypuštěna, ale zvětšení mezi polní rovinou PR a výstupní obrazovou rovinou VR interferometru zůstává stejné pro obě větve.
- Optická sestava na obrázku 1(d): Soustava interferometru je analogií prvního bodu s tím rozdílem, že referenční výstupní objektiv VO_1 je vypuštěn, ale zvětšení mezi polní rovinou PR a výstupní rovinou VR interferometru zůstává stejné pro obě větve.
- Optická sestava na obrázku 1(e): Soustava interferometru je analogií libovolného předešlého bodu s tím rozdílem, že v obou větvích, tedy v referenční i předmětové, je zařazena difrakční mřížka DM v blízkosti meziobrazů MO předmětové a referenční větve. Difraktované svazky pak prochází výstupními objektivy VO a jsou zrcadly $Z_{6,7}$ směrovány do výstupní roviny interferometru VR.
- Soustava interferometru je analogií libovolného předešlého bodu s tím rozdílem, že alespoň jedna transmisní difrakční mřížka DM je nahrazena difrakční mřížkou reflexní.

Vzhledem k použití plošného polychromatického zdroje světla je u všech těchto případů nutno (kromě dodržení stejného zvětšení mezi polní rovinou PR a výstupní rovinou VR) interferometru zaručit i stejnou optickou délku větví. Proto je nutno do každé sestavy z předešlého výčtu vložit soustavu zrcadel, dovolujících opticky natahovat délku větve. Kromě toho musí optické sestavy obsahovat i prvek dovolující příčný pohyb obrazu referenčního vzorku ve výstupní rovině interferometru.

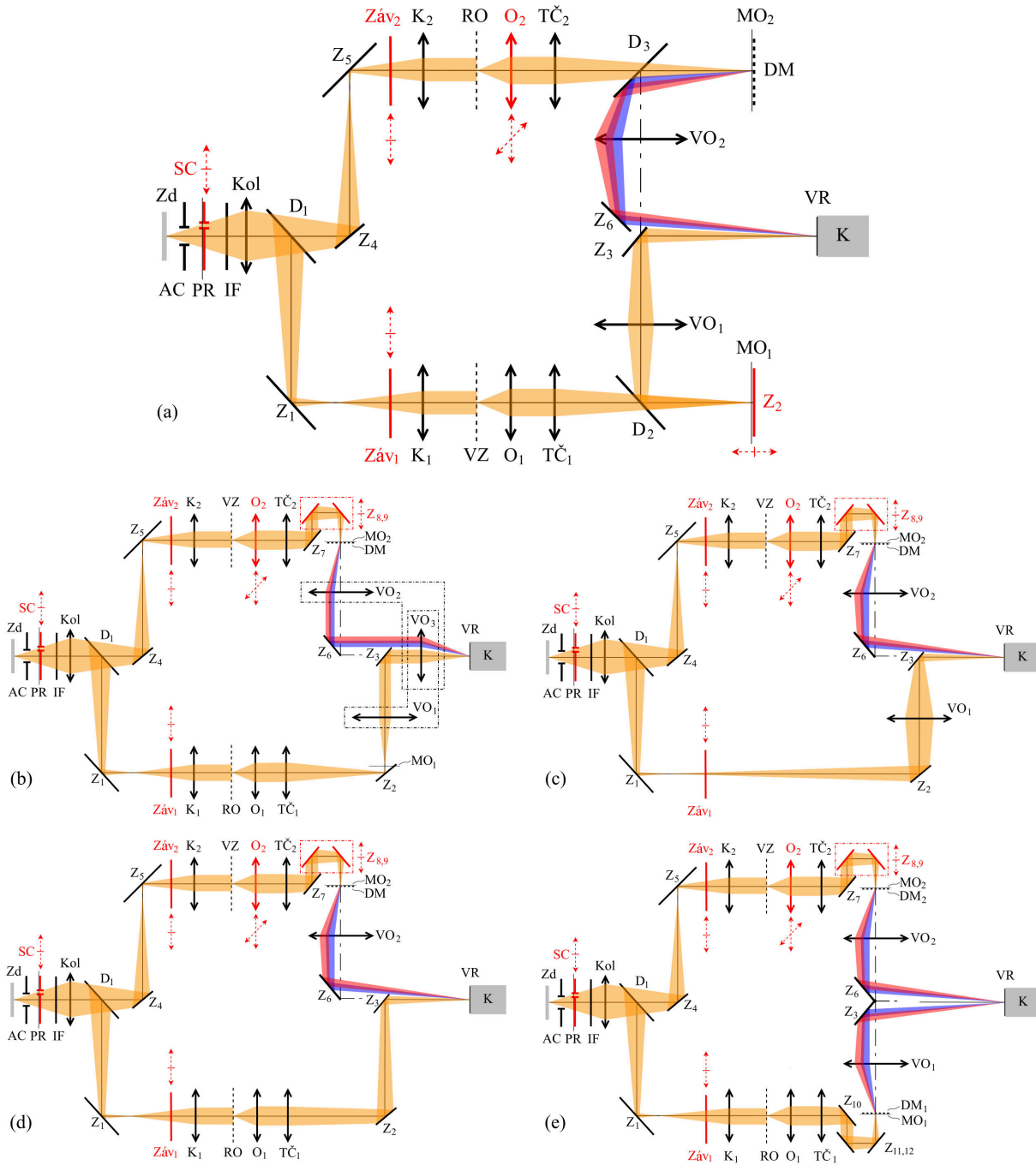
4.2 Fluorescenční holografický mikroskop

Tento mikroskop je dalším z vývojových kroků CCHM. Tento mikroskop slouží k tvorbě optických řezů vzorkem a k výpočtu rozložení indexu lomu ve vzorku. Princip mikroskopu byl patentován [51] a já se podílel na jeho mechanickém návrhu, stavbě a tvorbě řídicího

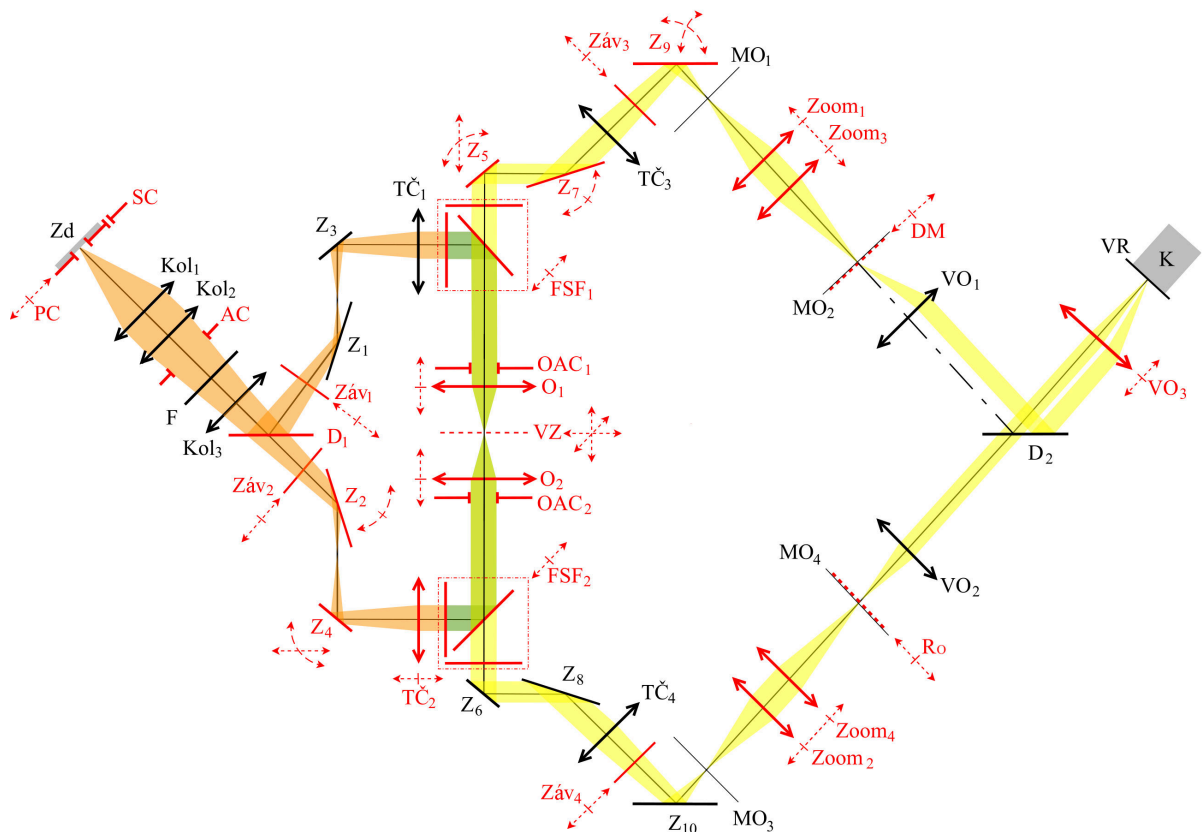
softwaru. Optická sestava FHM je zobrazena na obrázku 2. Zdrojem osvětlení Zd tohoto mikroskopu je defokusovaný výboj xenonové lampy. Rovina polní clony PC je zobrazována kolektorovými čočkami $Kol_{1,2,3}$, tubusovými čočkami $TL_{1,2}$ a mikroskopovými objektivy $O_{1,2}$ do roviny vzorku VZ. Světelný svazek je pomocí děliče D_1 a zrcadly $Z_{1,2,3,4}$ rozdělen do dvou opticky ekvivalentních cest osvětlovacích větví. Plynule měnitelná aperturní clona AC a aperturní clony objektivů OAC jsou umístěny v optickém svazku pro nastavení prostorové koherence jimi procházejícího světla. Navíc OAC clony slouží ke snížení numerické apertury mikroskopových objektivů $O_{1,2}$. Intenzitu osvětlení lze regulovat vkládáním šedých filtrů F. Volba excitačního spektra vlnových délek a emisního spektra vlnových délek je pro fluorescenční aplikaci mikroskopu je zajištěna výměnou fluorescenčních sestav filtrů FSF. Vzorek VZ je z objektové roviny zobrazen do výstupní roviny interferometru VR pomocí mikroskopových objektivů $O_{1,2}$, tubusových čoček $TČ_{1,2}$, zoomovacích soustav $Zoom_{1,2,3,4}$ a výstupních objektivů $VO_{1,2,3}$. Při zobrazení vznikají meziobrazy $MO_{1,3}$ za tubusovými čočkami $TČ_{3,4}$ a meziobrazy $MO_{2,4}$ za zoomovacími soustavami $Zoom_{3,4}$. Transmisní difrakční mřížka DM a referenční okénko Ro jsou umístěny v rovině meziobrazu $MO_{2,4}$ za zoomovacími soustavami $Zoom_{3,4}$. Ve výstupní rovině VR pak vzniká interferenční obrazec se shodnou nosnou prostorovou frekvencí f_c proužků pro všechny vlnové délky emisního světla vzorku a pro všechny emitující body vzorku VZ. V blízkosti výstupní roviny VR je umístěna CMOS kamera K. Principiálně optický systém tvoří off-axis holografické uspořádání, které je jako u CCHM založeno na interferenci nultého a prvního difrakčního řádu [43].

4.3 Zpracování obrazu

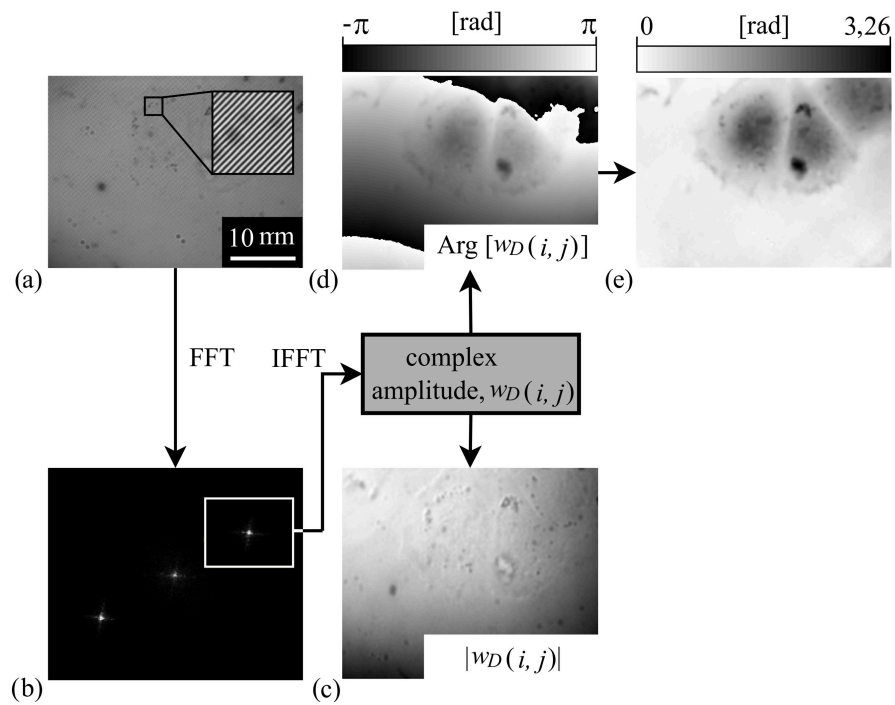
Detektorem K pořízený hologram je numericky zpracován dle schématu na obrázku 3. Nejdříve je provedena Fourierova transformace pořízeného hologramu. Tím je získáno spektrum prostorových frekvencí obrazu. Ze spektra je vybráno postranní pásmo prostorových frekvencí nosné frekvence f_c . Poloměr vybrané oblasti je závislý na rozlišovací schopnosti a zvětšení mikroskopu; jsou vybírány jen takové frekvence, které je optika mikroskopu schopna přenést do své výstupní roviny VR. Nulová prostorová frekvence je posunuta do středu výběru spektra a to je vynásobeno Hanningovou váhovou funkcí [67]. Komplexní amplituda rekonstruované vlny (matice měřeného holografického signálu) $w_D(i, j)$ je vypočtena inverzní Fourierovou transformací získaného výběru spektra. Z ní je dále vypočten fázový obraz $\text{Arg}[w_D(i, j)]$ a amplitudový obraz $|w_D(i, j)|$. Kvantitativní fázový obraz je získán navazovací procedurou a procedurou kompenzující deformaci jeho pozadí [68, 69].



Obrázek 1: (a) Optická sestava CCHM, (b) - (e) varianty optických sestav se zjednodušenou referenční větví: Zd - zdroj světla, AC - aperturní clona, IF - interferenční filtr, Kol - kolektor, Z - zrcadla, K - kondenzory, VZ - vzorek, RO - referenční objekt, MO - roviny meziobrazů, O - objektivy, TČ - tubusové čočky, DM - difrakční mřížky, D - dělič svazků, VO - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, K - CCD kamera (detektor). Motorizované části CCHM (červeně): mechanismus pro vkládání seřizovací clony SC, počítačem řízené závěrky Záv, 2D příčný lineární stolek objektivů O₂, lineární stolek pro osový pohyb zrcadla Z₂ (případně pro osový pohyb zrcadel Z_{8,9}).



Obrázek 2: Optická sestava FHM: Zd - zdroj světla, PC - polní clona, AC - aperturní clona, F - šedé filtry, Kol - kolektory, Z - zrcadla, VZ - vzorek, FSF - fluorescenční sestavy filtrů (excitační filtry, dichroická zrcadla, emisní filtry), OAC - aperturní clony objektivů, O - objektivy, MO - roviny meziobrazů, Zoom - zoomovací objektivy, DM - difrakční mřížky, Ro - referenční okénko, D - děliče svazků, VO - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, K - CMOS kamera (detektor). Motorizované části FHM (červeně): mechanismus pro vkládání seřizovací clony SC, mechanismus pro změnu průměru polní clony PC, mechanismy pro změny průměrů aperturní clony AC a aperturních clon objektivů OAC, počítačem řízené závěrky Záv, mechanismy pro změnu fluorescenčního kanálu (lineární výměník děličů svazků D₁, lineární výměníky fluorescenčních sestav filtrů FSF_{1,2}, lineární výměníky difrakčních mřížek DM a referenčních okének Ro), osově lineární stolky pro oba dublety tubusové čočky TČ₂, vázané pohyby zrcátek Z_{2,4} a Z_{5,7}, osově lineární stolky objektivů O, 3D lineární stolek vzorku VZ, 2D rotační stolek pro zrcátko Z₉, změna ohniskových vzdáleností zoomovacích objektivů Zoom, změna ohniskové vzdálenosti a ostření VO₃.



Obrázek 3: Zpracování obrazu: (a) hologram, (b) spektrum prostorových frekvencí s výřezem spektra kolem nosné frekvence f_c , (c) amplitudový obraz, (d) fázový obraz, (e) kvantitativní fázový obraz.

5 Teorie zobrazení pro CCHM a FHM

Oba mikroskopy se po optické stránce mírně odlišují. CCHM mikroskop využívá Köhlerův princip osvětlení vzorku VZ a referenčního objektu RO (viz obrázek 1). Prvá vlna je modulována průchodem přes vzorek VZ, zatímco druhá vlna prochází referenčním objektem RO a zůstává téměř nezměněna. Druhý mikroskop, FHM, je sice založen na holografickém principu (viz obrázek 2), avšak zdrojem světla je emitující fluorescenční barvivo obsažené v pozorovaném vzorku. To znamená, že obě interferující vlny nesou informace o vzorku, v němž jsou generovány. Nicméně oba mikroskopy spojuje jedna klíčová vlastnost. Interferující vlny jsou prostorově i časově nekoherentní, a jsou tedy schopny tvořit interferenční strukturu jen při perfektním vyladění mikroskopu. Nejprve se budeme zabývat případem CCHM mikroskopu.

5.1 Teorie zobrazení pro CCHM

Aby bylo možné prokázat, že průměrná hodnota holografického signálu je vhodnou veličinou pro seřízení mikroskopu, je nutno popsat její závislost na klíčových parametrech podstatných pro naladění mikroskopu, tedy na rozdílu optických délek ΔL obou zobrazovacích větví, na vzájemném posuvu obrazů ve výstupní rovině VR, který je popsán odpovídajícím vektorem posuvu $\mathbf{q}_f = (x_f, y_f)$ v předmětové rovině, na velikosti poměrného zvětšení M mezi oběma zobrazovacími větvemi a na odchylce Δz osové pozice objektivu. Jelikož je rovina vzorku VZ osvětlena köhlerovsky, lze určit teoretickou hodnotu holografického signálu pomocí následujícího vztahu (viz rovnici (2.20) [64]):

$$w(\mathbf{q}_t) = \iiint_{-\infty}^{\infty} u_1(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) u_2^*(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) K_z K^{-3} d^3 \mathbf{K}, \quad (1)$$

kde $u_1(\mathbf{q}_t, \mathbf{K})$ je komplexní amplituda první vlny, $u_2(\mathbf{q}_t, \mathbf{K})$ je komplexní amplituda druhé vlny, $\mathbf{q}_t = (x, y)$ je vektor kartézských souřadnic ve výstupní rovině VR, který je podělen zvětšením mezi předmětovou rovinou v příslušné větvi a výstupní rovinou VR, \mathbf{K} je redukovaný vlnový vektor rovinné vlny v prostoru za kondenzorem, která odpovídá jednomu bodu zdroje ZD, $|\mathbf{K}| = K = 1/\lambda$, λ je vlnová délka světla, K_z je souřadnice redukovaného vlnového vektoru \mathbf{K} ve směru optické osy.

Předpokládáme, že naladěnému stavu mikroskopu odpovídá dosažení určitých hodnot výše uvedených klíčových parametrů ($\Delta L = 0 \mu\text{m}$, $\mathbf{q}_f = 0 \mu\text{m}$, $M = 1$, $\Delta z = 0 \mu\text{m}$). Vložení vzorku nemá vliv na hodnoty těchto parametrů - mikroskop zůstává v naladěném stavu bez ohledu na jeho přítomnost. Proto můžeme provést teoretickou analýzu s předpokladem, že do mikroskopu není vložen vzorek.

Na okamžik dále předpokládejme, že mikroskop je naladěn, tedy obě větve mikroskopu jsou opticky ekvivalentní ($\Delta L = 0 \mu\text{m}$, $\mathbf{q}_f = 0 \mu\text{m}$, $M = 1$, $\Delta z = 0 \mu\text{m}$), pak lze podle rovnice (2.18) [64] uvažovat interferující vlny ve tvaru:

$$u_1(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) = u_2(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}) = \sqrt{i(\mathbf{K})} P_C(\mathbf{K}) P_T(\mathbf{K}) \exp(2\pi i \mathbf{K}_t \cdot \mathbf{q}_t), \quad (2)$$

kde \mathbf{K}_t je příčná část redukovaného vlnového vektoru \mathbf{K} , $i(\mathbf{K})$ je spektrální hustota zdroje Z_d , P_C je pupilová funkce kondenzoru, P_T je pupilová funkce soustavy objektivu a tubusové čočky.

Nyní do vztahu (2) zahrňme parametry rozladění mikroskopu. Předpokládejme, že první vlna bude ovlivněna rozdílem optických délek ΔL , vzájemným posuvem obrazů ve výstupní rovině VR $\mathbf{q}_f = (x_f, y_f)$ a změnou osové pozice objektivu Δz . Pokud jsou oba obrazy větví vzájemně posunuty o nenulový vektor $\mathbf{q}_f = (x_f, y_f)$, pak je zřejmě nutno výraz (2) vynásobit funkcí $\exp(-2\pi i \mathbf{K}_t \cdot \mathbf{q}_f)$. Pokud je optická délka v obrazovém prostoru první větve větší o ΔL vůči druhé větvi, pak je nutno rovnici (2) vynásobit komplexní exponenciálou s argumentem závislým na ΔL podle následující úvahy. Fázový posuv rovnoběžného svazku, který s optickou osou svírá úhel ψ , je na osové vzdálenosti ΔL (index lomu v obrazovém prostoru $n \approx 1$) roven $\Delta\Phi_\psi = 2\pi K \Delta L \cos\psi$. Za předpokladu, že pro mikroskopové objektivy platí sinová podmínka, odvodíme vztah $\sin\psi = NA_s/m \leq NA/m$ pro svazek dopadající pod maximálním úhlem ψ v obrazovém prostoru, kde NA_s je numerická apertura osvětlovacího svazku za kondenzorem (viz [64]). Maximální poměr NA/m byl stanoven pro objektivy NIKON CFI S Fluor 20x/0,75, kde $\psi = 0,038$ rad. Za předpokladu typické vlnové délky $\lambda = 650$ nm a pro maximální $\Delta L = 100$ μ m činí rozdíl fázových posuvů osového svazku a svazku pod maximálním úhlem $\Delta\Phi_0 - \Delta\Phi_\psi = 2\pi K \Delta L (1 - \cos\psi) = 0,21\pi$ rad. Hodnota fázového rozdílu je zanedbatelná i pro poměrně vysokou hodnotu ΔL , a proto lze aproximovat fázový posuv výrazem pro $\Delta\Phi_0$ pro všechny úhly svazku. Výsledný fázor pak nabývá tvaru $\exp(-2\pi i K \Delta L)$. Pro popis vlivu posunu mikroskopového objektivu o Δz vynásobme rovnici (2) výrazem $\exp\left[2\pi i \left(\sqrt{K^2 - K_t^2} - K\right) \Delta z\right]$, kde K_t je velikost \mathbf{K}_t . Tento výraz pro fázové zpoždění lze odvodit následující úvahou. Považujme mikroskopový objektiv za aplanatický, tedy je splněna sinová podmínka. Za tohoto předpokladu rovinná vlna vstupující do objektivu z předmětového prostoru vystupuje do obrazového prostoru opět jako rovinná vlna s jiným vlnovým vektorem téže délky [70]. Dojde-li k posuvu objektivu směrem do obrazového prostoru, pak vlna v předmětové části získá fázový přírůstek $K_z \Delta z$ a v obrazové části se fáze sníží o $K'_z \Delta z$ (pro index lomu $n \approx 1$). Předpokládáme-li opět, že fázový posuv vlny v obrazovém prostoru závisí na úhlu jejího sklonu zanedbatelným způsobem, pak platí $K'_z \approx K$. Jelikož platí vztah $K_z = \sqrt{K^2 - K_t^2}$ je výsledný dráhový rozdíl roven $\left(\sqrt{K^2 - K_t^2} - K\right) \Delta z$. Po zahrnutí všech zmíněných justážních parametrů do rovnice (2) dostaneme již kompletní výraz pro první vlnu:

$$\begin{aligned} u_1(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}; \mathbf{q}_f, \Delta L, \Delta z) &= \sqrt{i(\mathbf{K})} P_C(\mathbf{K}) P_T(\mathbf{K}) \exp(2\pi i \mathbf{K}_t \cdot \mathbf{q}_t) \exp(2\pi i \mathbf{K}_t \cdot \mathbf{q}_f) \\ &\times \exp(-2\pi i K \Delta L) \exp\left[2\pi i \left(\sqrt{K^2 - K_t^2} - K\right) \Delta z\right]. \end{aligned} \quad (3)$$

Kompletní výraz pro druhou vlnu získáme tak, že v rovnici (2) vynásobíme vektor \mathbf{q}_t poměrným zvětšením M . Výsledný výraz lze psát ve tvaru:

$$u_2(\mathbf{q}_t, \mathbf{K}; M) = \sqrt{i(\mathbf{K})} P_C(\mathbf{K}) P_T(\mathbf{K}) \exp(2\pi i \mathbf{K}_t \cdot \mathbf{q}_t M). \quad (4)$$

Integraci (1) podle souřadnic vektoru \mathbf{K} lze převést na integraci podle souřadnic vektoru \mathbf{K}_t a velikosti K vektoru \mathbf{K} . Jakobián této transformace je K/K_z . Po dosazení výrazů

(3), (4) do výrazu (1) dostáváme vztah

$$\begin{aligned}
w(\mathbf{q}_t; \mathbf{q}_f, M, \Delta L, \Delta z) &= \int_0^\infty K^{-2} \iint_{-\infty}^\infty i(\mathbf{K}) P_C(\mathbf{K}) P_C^*(\mathbf{K}) P_T(\mathbf{K}) P_T^*(\mathbf{K}) \\
&\times \exp[2\pi i \mathbf{K}_t \cdot \mathbf{q}_t (1 - M)] \exp(2\pi i \mathbf{K}_t \cdot \mathbf{q}_f) \exp(-2\pi i K \Delta L) \\
&\times \exp\left[2\pi i \left(\sqrt{K^2 - K_t^2} - K\right) \Delta z\right] d^2 \mathbf{K}_t dK.
\end{aligned} \tag{5}$$

Pro nepřilíš vysoké numerické apertury (s hodnotou pod 0,5) lze pupilovou funkci kondenzoru vyjádřit vztahem $P_C(\mathbf{K}) = \text{circ}[(K_t n)/(K NA_s)]$ (viz [64], části 2.2.4 a 6.1), kde $\text{circ}(r)$ je rotačně symetrická funkce [71] jednotková na oblasti s poloměrem 1, $K_t = |\mathbf{K}_t|$, kde n je index lomu objektového prostoru mikroskopových objektivů $O_{1,2}$, a kde NA_s je nejmenší numerická apertura optických prvků mikroskopu. Pupilová funkce objektivu a tubusové čočky může být za stejných podmínek vyjádřena vztahem $P_T(\mathbf{K}) = \text{circ}[(K_t n)/(K NA)]$, kde NA je numerická apertura mikroskopového objektivu. Protože $NA_s \leq NA$, lze součin obou pupilových funkcí nahradit funkcí $\text{circ}[(K_t n)/(K NA_s)]$. Následně faktorizujeme funkci $i(\mathbf{K})$ na součin spektrální funkce $i_K(K)$ a funkce $i_t(\mathbf{K}_t)$ popisující rozložení intenzity světla v rovině zdroje světla Z_d pro Köhlerovo osvětlení [64]. Vztah (5) lze pak psát ve tvaru:

$$\begin{aligned}
w(\mathbf{q}_t; \mathbf{q}_f, M, \Delta L, \Delta z) &= \int_0^\infty K^{-2} i_K(K) \exp(-2\pi i K \Delta L) \iint_{-\infty}^\infty i_t(\mathbf{K}_t) \text{circ}\left(\frac{K_t n}{K NA_s}\right) \\
&\times \exp[2\pi i \mathbf{K}_t \cdot \mathbf{q}_t (1 - M)] \exp(2\pi i \mathbf{K}_t \cdot \mathbf{q}_f) \\
&\times \exp\left[2\pi i \left(\sqrt{K^2 - K_t^2} - 1\right) \Delta z\right] d^2 \mathbf{K}_t dK.
\end{aligned} \tag{6}$$

Předpokládáme-li, že rozložení intenzity v rovině zdroje je rotačně souměrné, může být dvojrozměrná Fourierova transformace ve vztahu (6) převedena na Hankelovu transformaci (viz [64], část 6.4.1)

$$\begin{aligned}
w(\mathbf{q}_t; \mathbf{q}_f, M, \Delta L, \Delta z) &= 2\pi \int_0^\infty i_K(K) \exp(-2\pi i K \Delta L) \\
&\times \int_0^{NA_s/n} i_T(\kappa) J_0\{2\pi K \kappa \cdot [\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t (M - 1)]\} \\
&\times \exp\left[2\pi i K \left(\sqrt{1 - \kappa^2} - 1\right) \Delta z\right] \kappa d\kappa dK,
\end{aligned} \tag{7}$$

kde $i_T(\kappa)$ nyní popisuje radiální rozložení intensity v rovině zdroje, přičemž $\kappa = \mathbf{K}_t/K$, $\kappa = |\kappa|$. Rovnice (7) popisuje holografický signál CCHM pro prostorově i časově nekoherentní zdroj v závislosti na justážních parametrech.

5.2 Teorie zobrazení pro FHM

Ke stanovení výrazu pro teoretický holografický signál w pro FHM mikroskop předpokládáme, že fluorescenční vzorek je nahrazen tenkým děličem svazků. Ten je osvětlován

köhlerovsky objektivem O_2 , tedy vlnou $u_2(\dots)$. Světlo je jím částečně odraženo zpět do objektivu O_2 a částečně propuštěno do objektivu O_1 . Navíc objektiv O_2 je přesně zaostřen na odraznou plochu děliče, což lze experimentálně zajistit. Pak jsou splněny stejné podmínky pro platnost vztahů (1) a (2) jako u CCHM mikroskopu. Analogicky je pak možno vztahy popisující obě vlny rozšířit o funkce obsahující justážní parametry mikroskopu. Předpokládejme, že první vlna bude opět ovlivněna rozdílem optických délek ΔL , vzájemným posuvem obrazů ve výstupní rovině VR $\mathbf{q}_f = (x_f, y_f)$ a změnou osové pozice objektivu Δz . Druhá vlna bude opět ovlivněna pouze poměrným zvětšením M . Jediná odlišnost vůči předešlému případu je dána konstrukcí FHM mikroskopu, kdy ke změně délky větve ΔL při justáži nedochází v obrazovém prostoru (za tubusovou čočkou TČ), ale v prostoru mezi objektivem O a jeho tubusovou čočkou TČ. Jelikož je opět rozdíl fáze paprsku jdoucího po optické ose a paprsku jdoucího vzhledem k optické ose pod maximálním úhlem zanedbatelný, platí i zbytek odvozených vztahů včetně výsledného vztahu pro teoretický holografický signál (7). Protože osvětlovací část optické soustavy je pro obě větve totožná, je zřejmé, že závěry odvozené za předchozích předpokladů platí i pro fluorescenčně emitovaný signál v předmětové rovině mikroskopu. Ten by sice lépe odpovídal situaci s kritickým, nikoli Köhlerovým osvětlením, ale je známo, že oba tyto typy osvětlení jsou koherenčně ekvivalentní (viz [70], kapitola 10.6).

5.3 Experimenty

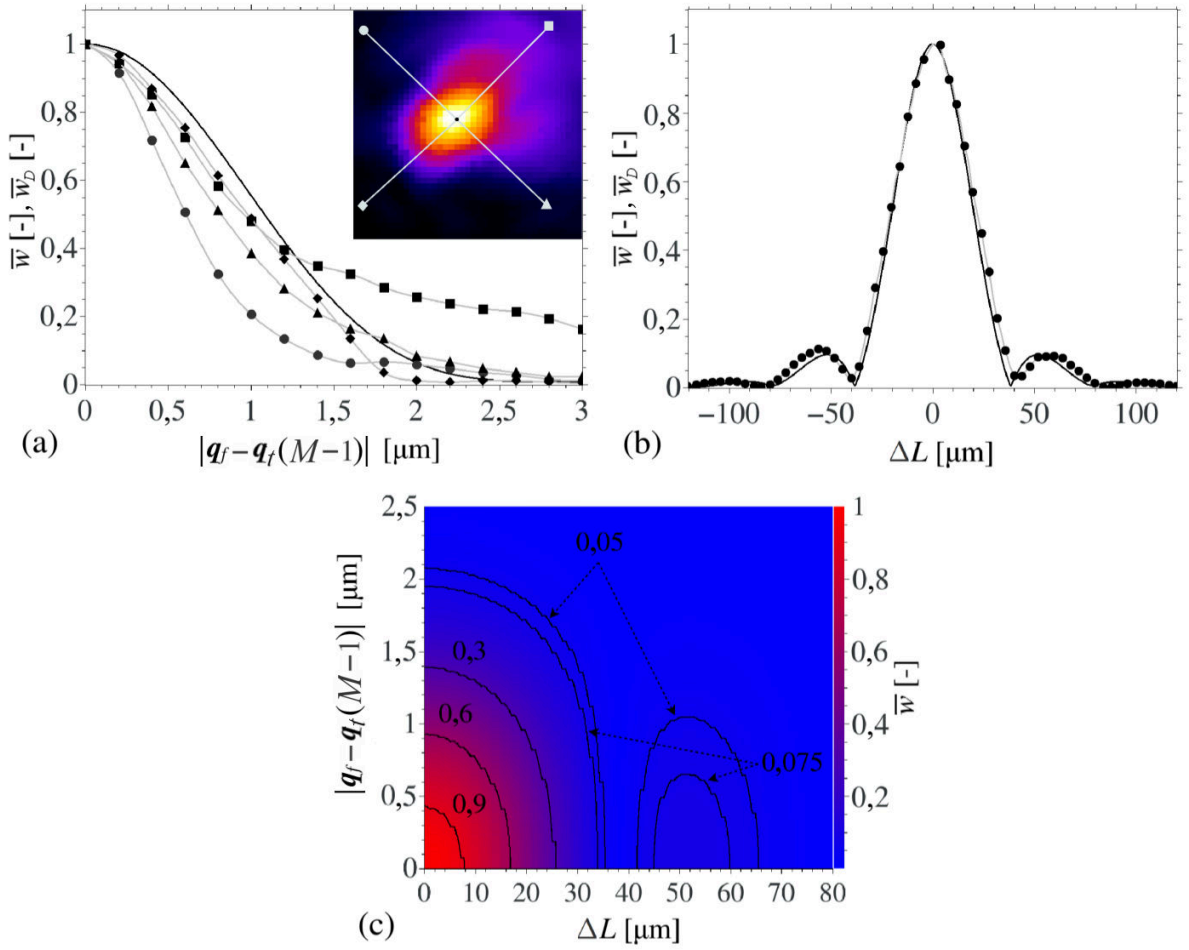
Je zřejmé, že hodnota $\bar{w} = |w|$ teoretického holografického signálu nabývá svého maxima pro $\Delta L = 0 \mu\text{m}$, $\mathbf{q}_f = 0 \mu\text{m}$ a $M = 1$ ($|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)| = 0 \mu\text{m}$) a pro $\Delta z = 0 \mu\text{m}$. Z toho důvodu se hodnota teoretického holografického signálu \bar{w} ukazuje jako významná veličina pro u obou mikroskopů. Alternativně byla při ověřovacích experimentech testována i veličina odvozená od signálu \bar{w} . Jedná se o podíl SNR , který je vypočten z hodnot matice měřeného holografického signálu (amplitudového obrazu) $w_D(i, j)$ viz dodatek A.

Výše popsany teoretický holografický signál \bar{w} dle rovnice (7) byl pro ověření porovnán s experimentálními daty z CCHM při $M = 1$. Tento mikroskop byl pro testování zvolen proto, že jeho optická sestava je stabilní a plně odladěná oproti experimentální sestavě FHM, na které byl testován vliv zvětšení $M \neq 1$ a vliv posunutí $\Delta z \neq 0 \mu\text{m}$. Do objektové roviny nebyl vložen vzorek. Měření bylo provedeno s plošným a spektrálně úzkopásmovým zdrojem světla. Spektrální funkce zdroje $i_K(K)$ byla dána spektrální propustností interferenčního filtru FB650-10 ($\lambda = 650 \text{ nm}$, FWHM = 10 nm) od firmy Thorlabs [72], jeho radiální rozložení intensity $i_T(\kappa)$ byl aproximován gaussovskou funkcí [67] s proporcionální reciprokou směrodatnou odchylkou $\alpha = 2,5$, která byla nalezena fitováním teoretické křivky na experimentální data. K eliminaci šumu byla matice měřeného holografického signálu $w_D(i, j)$ průměrována přes celé obrazové pole dle vztahu

$$\bar{w}_D = \sum_{i=0}^{N_I-1} \sum_{j=0}^{N_J-1} \frac{|w_D(i, j)|}{N_I N_J}, \quad (8)$$

kde \bar{w}_D je hodnota měřeného holografického signálu a N_I a N_J jsou rozměry matice měřeného holografického signálu (matice amplitudového obrazu) $w_D(i, j)$.

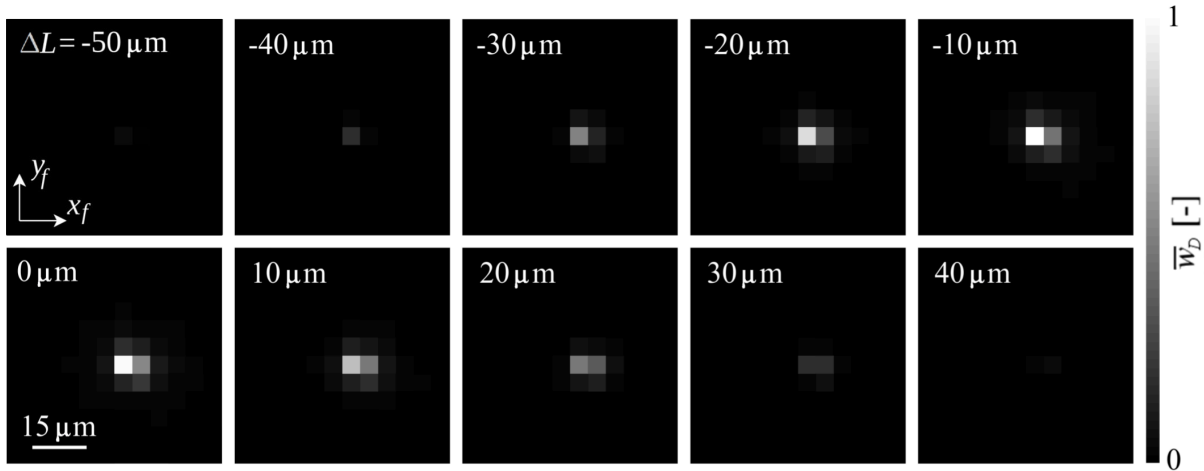
Na obrázku 4(a) je ukázáno porovnání závislostí hodnot teoretického a měřeného holografického signálu \bar{w} a \bar{w}_D na $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M-1)|$ pro $M = 1$. Naměřené křivky se od teoretických mírně odlišují. To je způsobeno zejména optickými aberacemi výstupního objektivu VO₂, který je umístěn za difrakční mřížkou DM v referenční větvi. Světlo difraktované do prvního řádu prochází okrajem apertury objektivu VO₂ (v porovnání s osovým šířením svazku v objektové větvi). Navíc příčný posuv objektivu O₂ vede k příčnému posuvu difraktovaného svazku v apertuře objektivu VO₂. Naproti tomu naměřené hodnoty holografického signálu na obrázku 4(b) perfektně kopírují teoreticky vypočtenou křivku. Měření na obrázku 4(b) bylo provedeno při $M = 1$ pro též zdroj světla jako na obrázku (a) a pro $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M-1)| = 0 \mu\text{m}$ při změně ΔL .



Obrázek 4: Porovnání mezi teoretickými hodnotami teoretického holografického signálu \bar{w} (plná černá) a naměřeným holografickým signálem \bar{w}_D (čáry se symboly). (a) Závislost signálu na $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M-1)|$ pro identické délky větví interferometru, tj. $\Delta L = 0 \mu\text{m}$ a pro jednotkové poměrné zvětšení $M = 1$. Čáry se symboly reprezentují profily hodnot signálu měřené z bodu z $\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M-1) = (0,0) \mu\text{m}$ do čtyř směrů (viz vložený obrázek). (b) Závislost změny hodnot signálu na velikosti ΔL pro $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M-1)| = 0 \mu\text{m}$ a $M = 1$. (c) Vrstevnicový graf závislosti teoretického holografického signálu \bar{w} na $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M-1)|$ a na ΔL pro $M = 1$. Hodnoty \bar{w} a \bar{w}_D jsou normovány.

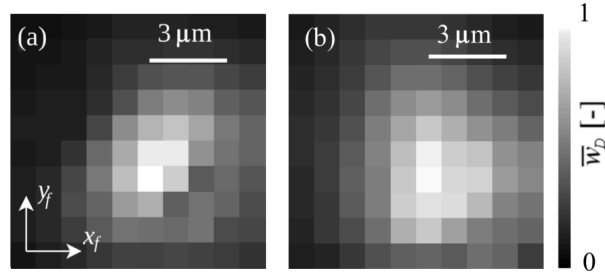
Hodnota teoreticky vypočteného signálu \bar{w} je závislá na $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)|$ a ΔL . Tato závislost je pro $M = 1$ ukázána na obrázku 4(c). Protože je graf symetrický podle souřadnicových os, je zobrazen pouze jeho první kvadrant. Jeho globální maximum \bar{w}_{max} je umístěno do počátku grafu. Lokální maximum $\bar{w}_{l,i}$ podél osy ΔL je důsledkem tvaru spektrální funkce zdroje světla $i_K(K)$. Průběh ve směru osy $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)|$ je hladký bez bočních maxim. To je výsledkem gaussovského tvaru intensity $i_T(\kappa)$. Hodnota teoretického holografického signálu \bar{w} narůstá podél osy ΔL pro konstantní $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)|$ a také narůstá podél osy $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)|$ pro konstantní ΔL , viz experimentální data na obrázku 5.

Abychom prokázali, že měřený holografický signál \bar{w}_D má své globální maximum pro $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)| = 0 \mu\text{m}$ a $\Delta L = 0 \mu\text{m}$ pro $M = 1$ také s polychromatickým světelným zdrojem, bylo provedeno měření obdobně jako předešlém případě, přičemž byl interferenční filtr odstraněn. Na obrázku 6 jsou porovnány měření obsahující maximální hodnoty $\bar{w}_{D,max}$ pro případ spektrálně úzkopásmového a spektrálně širokopásmového zdroje světla. Širokopásmové osvětlení vede k rozšíření oblasti okolo $\bar{w}_{D,max}$ (obrázek rehrubaserbila(b)) v porovnání s spektrálně úzkopásmového osvětlení (obrázek 6(a)). Toto rozšíření oblasti zvýšených hodnot je způsobeno superpozicí oblastí zvýšených hodnot signálu odpovídajících rozdílným vlnovým délkám. Tyto oblasti se ideálně nepřekrývají z důvodu chromatických aberací optického zobrazovacího systému. Měřený holografický signál \bar{w}_D je významná veličina pro posouzení úrovně seřízení obou holografických mikroskopů nejen v případě spektrálně úzkopásmového, ale také a spektrálně širokopásmového zdroje světla.



Obrázek 5: Měřená závislost holografického signálu \bar{w}_D na vektoru posunutí $\mathbf{q}_f = (x_f, y_f)$ a na rozdílu optických drah ΔL pro $M = 1$. Hodnoty úrovně šedi pixelů (malé čtverce) každého podobrazu reprezentují hodnotu měřeného holografického signálu průměrovanou přes celé zorné pole \bar{w}_D pro rozdílné hodnoty $\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)$, a pro podobraz konstantní ΔL a $M = 1$. Průměrné hodnoty \bar{w}_D jsou normovány vůči svému maximu v rámci celého měření.

Doplňme studii výše o experiment provedený na experimentální sestavě FHM, při němž byl sledován vliv zvětšení M na velikost \bar{w}_D . Fluorescenční vzorek byl nahrazen blánovým děličem osvětleným výbojkou opět přes interferenční filtr FB650-10 ($\lambda =$

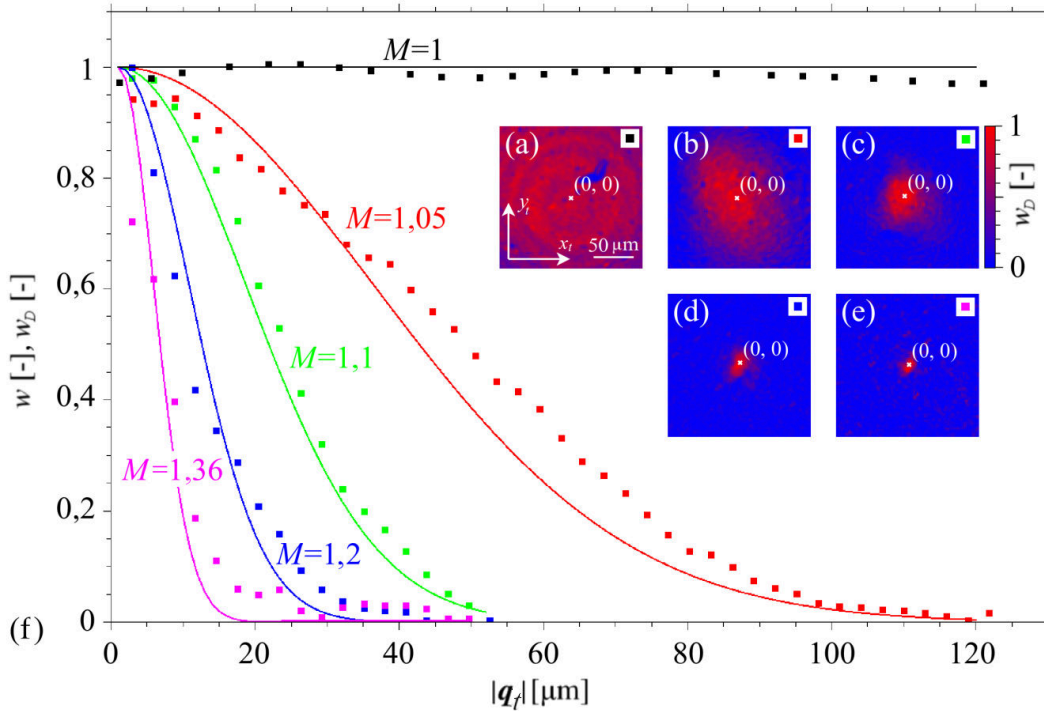


Obrázek 6: Měřená závislost měřeného holografického signálu \bar{w}_D na vektoru posunutí $\mathbf{q}_f = (x_f, y_f)$ (měření \bar{w}_D je prezentováno stejně jako na obrázku 5, $\Delta L = 0 \mu\text{m}$ a $M = 1$) pro (a) spektrálně úzkopásmový zdroj světla ($\lambda = 650 \text{ nm}$, $\text{FWHM} = 10 \text{ nm}$), (b) širokopásmový zdroj světla. Hodnoty \bar{w}_D jsou normovány; Normovaná maximální hodnota $\bar{w}_D < 1$ pro $\Delta L \neq 0 \mu\text{m}$.

650 nm, $\text{FWHM} = 10 \text{ nm}$), takže spektrální funkce zdroje $i_K(K)$ byla stejná jako v případě měření na CCHM. Radiální rozložení intensity světla $i_T(\kappa)$ bylo aproximováno gaussovským rozložením [67] s proporcionální reciprokou směrodatnou odchylkou $\alpha = 4,0$, která byla nalezena fitováním teoretické křivky na experimentální data. Tato odchylka od hodnoty nalezené pro CCHM je dána povahou simulovaného zdroje, protože oproti CCHM není zdrojem výstup světlovodu, ale defokusovaný obraz výboje. To však nepředstavuje překážku pro níže navrhované a testované metody justáže.

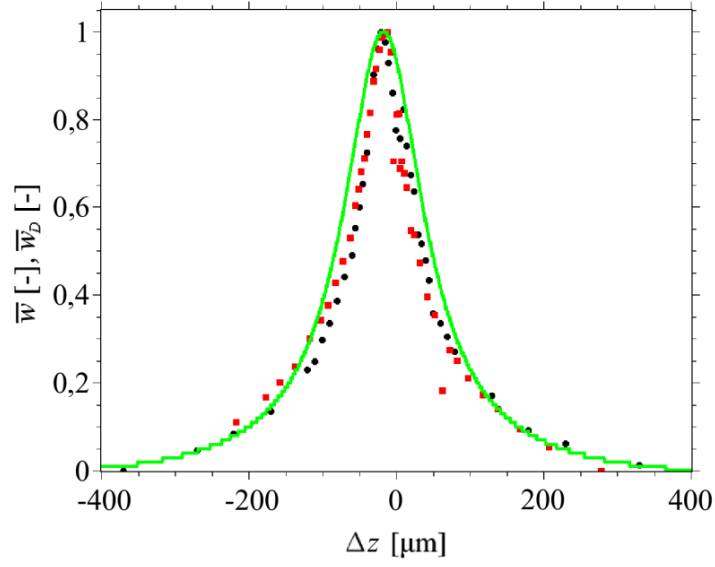
Zvětšuje-li se velikost poměrného zvětšení M , dochází k postupnému omezení oblasti zorného pole na kterém lze lokalizovat interferenční proužky podle obrázku 7. Toto omezení je způsobeno tím, že rovnice (7) pro teoretický holografický signál je závislá na $|\mathbf{q}_t|$ v argumentu Besselovy funkce a tato závislost se projevuje pouze pro $M \neq 1$. Na obrázcích 7(a)-(e) je zobrazen výřez z matice hodnot měřeného holografického signálu pro zvětšení M je prvkem $\{1, 1,05, 1,1, 1,2, 1,36\}$, pro $\Delta L = 0 \mu\text{m}$ a $|\mathbf{q}_f| = 0 \mu\text{m}$. Průměrováním těchto hodnot v okolí $\mathbf{q}_t = (0,0)$ byly získány radiální profily změn hodnot měřeného holografického signálu \bar{w}_D a porovnány s teoretickým holografickým signálem \bar{w} v grafu 7(f). Z tohoto měření jasně vyplývá, že je-li poměrné zvětšení větví $M = 1$, nedochází k omezení oblasti zorného pole, na kterém lze lokalizovat interferenční proužky a následně měřený holografický signál \bar{w}_D nabývá svého maxima.

Posledním experimentem bylo ověření závislosti velikosti signálu \bar{w}_D na odchylce polohy objektivu Δz . Opět jako v předešlém případě byl fluorescenční vzorek nahrazen blánovým děličem, který byl osvětlen výbojkou přes interferenční filtr FB650-10 ($\lambda = 650 \text{ nm}$, $\text{FWHM} = 10 \text{ nm}$). Spektrální funkce zdroje $i_K(K)$ byla tudíž stejná jako u měření na CCHM. Radiální rozložení intenzity $i_T(\kappa)$ bylo aproximováno Gaussovým rozložením [67] s proporcionální reciprokou standardní odchylkou $\alpha = 4,0$, která byla stanovena v předešlém experimentu. Podle experimentálních dat byla nalezena fitováním reálná numerická apertura objektivů $O_{1,2}$. Ta byla při tomto experimentu snížena na $NA = 0,2$ přivřením aperturních clon objektivů OAC. Na obrázku 8 je uvedena závislost velikosti měřeného holografického signálu \bar{w}_D na velikosti posunutí Δz objektivu O. Jak je patrné z teoretické křivky a z křivky naměřené, dochází při rostoucím posunutí k úbytku velikosti signálu. Tohoto jevu je tedy možno využít k nalezení identické roviny ostrosti



Obrázek 7: (a) - (e) Výřezy z matice hodnot měřeného holografického signálu w_D okolo optické osy $\mathbf{q}_t = (x_t, y_t) = (0, 0) \mu\text{m}$ mikroskopu pro různé hodnoty poměrného zvětšení M , pro $|\mathbf{q}_f| = 0 \mu\text{m}$ a $\Delta L = 0 \mu\text{m}$. (f) Porovnání závislostí teoretických hodnot holografického signálu w (plná čárna) a měřených hodnot holografického signálu w_D (symboly) v závislosti na velikosti vektoru polohy $|\mathbf{q}_t|$ pro různé hodnoty M . Průběhy křivek w_D jsou získány radiálním průměrováním hodnot výřezů. Hodnoty w a w_D jsou normovány.

pro oba objektivy O FHM mikroskopu. Autofokusační metoda pro CCHM je založena na jiném principu a je konstrukcí přístroje umožněna až pro plně robotizovanou komerční verzi mikroskopu Q-PHASE z produkce firmy TESCAN ORSAY HOLDING [73]. Tato metoda je popsána v dodatku B.



Obrázek 8: Závislost hodnot měřeného holografického signálu \bar{w}_D (symboly) a hodnot teoretického holografického signálu \bar{w} (plná čára) v závislosti na posunutí Δz objektivu O_1 při $M = 1$, $|\mathbf{q}_f| = 0 \mu\text{m}$ a $\Delta L = 0 \mu\text{m}$. Měření bylo opakováno pro dvě nastavení objektivu O_2 kolem uživatelem určené roviny ostrosti (výsledky vyznačeny červenými kroužky a černými čtverečky). Hodnoty \bar{w} a \bar{w}_D jsou normovány.

6 Justážní procedury a jejich testování

Pro oba mikroskopy byly na základě výše popsaných experimentů vytvořeny justážní metody které zaručují jejich plné automatizované seřízení mikroskopů. Většina procedur je principiálně shodná a aplikovatelná pro oba mikroskopy. Níže popsané procedury jsou testovány a je možno je rozdělit do dvou kategorií. Prvou jsou procedury inicializační. Tyto procedury jsou prováděné před začátkem vlastního experimentu a vedou k plnému naladění mikroskopu. Druhou kategorií jsou procedury udržující naladěný stav mikroskopu.

U CCHM mikroskopu je možno testovat inicializační procedury jako celek, protože mikroskop při svém standardním používání má zdrojem světla neustále vysvíceno celé zorné pole a na celém zorném poli je zaznamenávána interference. Navíc je tento přístroj již komerčně dostupný, je přesně dáno jeho využití, jeho procedury justáže jsou prakticky ve finálním stavu, v současnosti se nemodifikují a byly z mé práce převzaty výrobcem mikroskopu (firmou TESCOAN ORSAY HOLDING). S touto firmou na základě mé práce vznikl patent [62], jenž tyto procedury popisuje. Také tyto procedury byly publikovány [66].

Oproti CCHM využívá FHM při svém standardním použití jako zdroj světla, které vytváří hologram, fluorescenci ve vzorku. To přináší omezení pro některé inicializační procedury, které předpokládají na vysvícené celé zorné pole. Proto jsou tyto (inicializační) procedury spouštěny před vlastním experimentem s náhradou fluorescenčního vzorku za blánový dělič při osvětlení excitační výbojkou přes interferenční filtr FB650-10. To umožňuje mikroskop předjustovat bez potřeby osvětlení zkoumaného fluorescenčního vzorku, který by se mohl vysvěcovat. Například při fluorescenčním pozorování buněk ve vodním prostředí s water dipping objektivy, kdy vzorek bude umístěn v bazénku a současný stolek mikroskopu bude nahrazen specializovaným nosičem. Zatím je vývoj FHM mikroskopu na svém počátku, budou pro něj hledány vhodné aplikace a tudíž i všechny jeho justážní procedury budou procházet v budoucnu úpravami. V této práci bude uveden jejich stávající stav, který odpovídá současnému využití přístroje (holografické pozorování fluorescence fixovaného vzorku s oboustranným osvětlením).

6.1 Popis pohyblivých částí mikroskopů

Pro potřeby justáže byly potřebné optické prvky obou mikroskopů motorizovány (viz obrázek 1 a obrázek 2). První skupina mechanismů je určena k dosažení různých hodnot q_f . Jedná se o XY lineární stolek objektivu O_2 v případě CCHM a 2D rotační mechanismus zrcátka Z_9 u FHM. Pro získání rozdílných délek větví interferometru ΔL CCHM byl nosič zrcátka Z_2 usazen na lineární stolek s podélným posuvem. FHM mikroskop má více možností, jak měnit délku větví. Prvou možností je změna délky větve v osvětlení posuvem zrcadla Z_4 a s ním vázanou vlastní rotací a rotací zrcadla Z_2 . Tato justáž je důležitá pro režim osvětlení s vytvořenou stojatou vlnou. Shodný princip změny délky větve je aplikován i v zobrazovací části mikroskopu pro zrcadla Z_5 a Z_7 . Také je možno synchronně měnit osové polohy objektivů O a vzorku VZ a tím dosáhnout změny délky větve ΔL jak v zobrazovací části, tak i v osvětlovací části mikroskopu. Zoomovacími soustavami

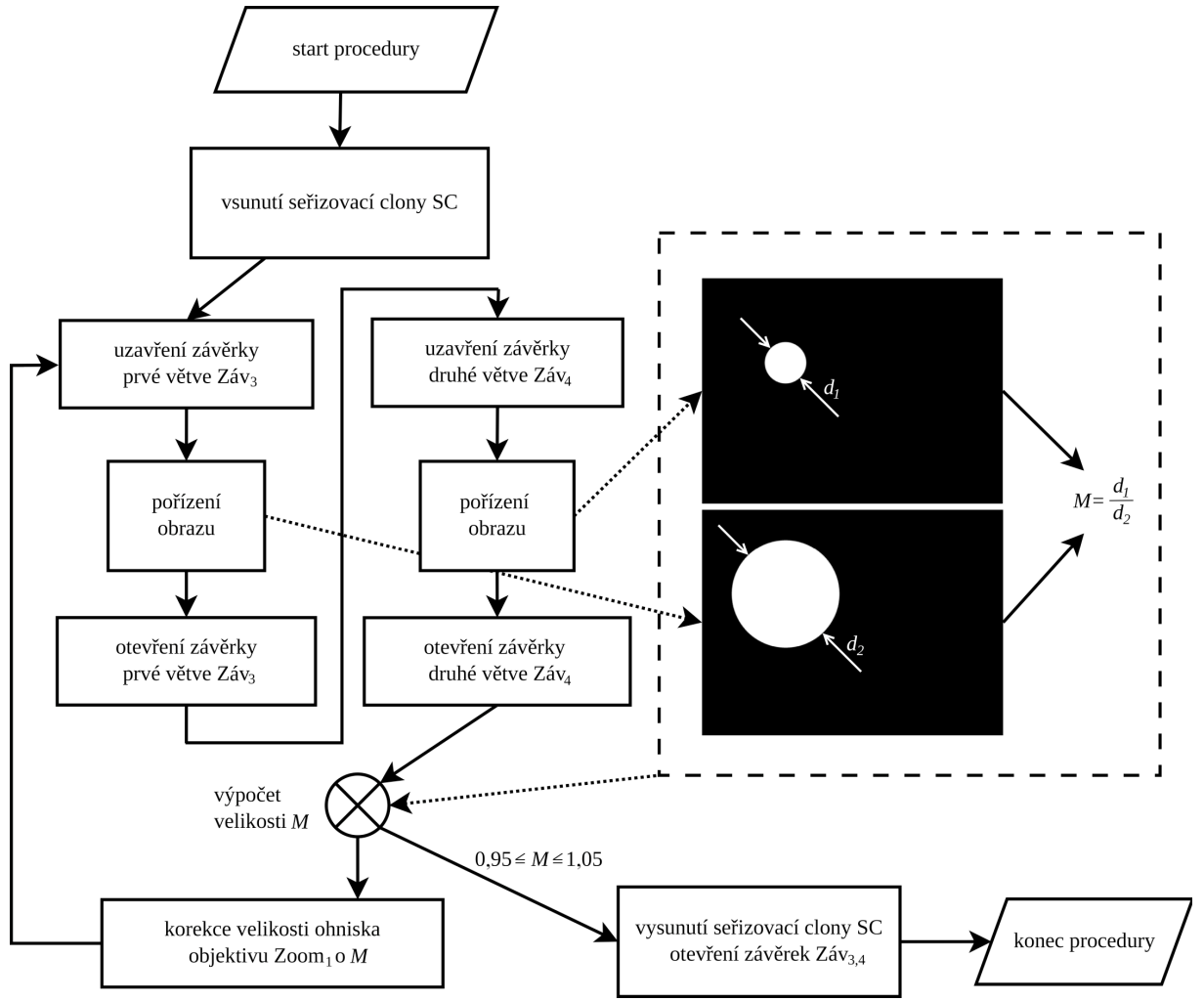
Zoom lze plynule nastavovat zvětšení pro každou ze zobrazovacích větví mikroskopu. Pro výchozí provoz přístroje jsou v současnosti zoomovací soustavy $\text{Zoom}_{1,2,3,4}$ nastaveny na zvětšení $M = 1$. Zoomovací soustavy $\text{Zoom}_{2,3,4}$ jsou fixně nastaveny na 50 % rozsahu pohybu servopohonu a zoomovací soustava Zoom_1 slouží při justáži ke korekci odchylek. I přes speciálně vyráběnou přesnou mechaniku, která zoomy nese, dochází k nedokonalosti v jejich nastavení. Ta je dána značnou vůlí v kulisovém mechanismu výsuvu zoomů a usazením jejich čoček v plastových objímkách. Výsledné zvětšení mikroskopu a jeho doostření je pak možno měnit i zoomovacím výstupním objektivem VO_3 . Záměrné obrazce obou mikroskopů byly umístěny do rovin opticky sjednocených s obrazovou rovinou, počítačem ovládané závěrky Záv byly umístěny do všech větví mikroskopů. Osvětlovací a zobrazovací svazky FHM jsou vybaveny říditelnými aperturami. Polní clonou PC je možno ovlivňovat velikost osvětleného pole vzorku, aby nedocházelo k vysvěcování fluoroforu mimo zorné pole objektivů. Aperturní clonou AC je možno upravovat aperturu osvětlovacích větví. Objektivové aperturní clony OAC dovolují snížit numerickou aperturu objektivů a tím zvyšovat hloubku ostrosti a prostorovou koherenci fluoreskujícího zdroje světla pro holografii. Výměnou fluorescenčních sestav filtrů FSF lze přepínat mikroskop z diaskopického modu do fluorescenčních modů. Ty jsou umístěny na lineárních říditelných vedeních stejně jako dělič světla D_1 , difrakční mřížka DM a referenční okénko Ro. Tyto komponenty jsou vhodně navrženy pro každý fluorescenční kanál.

6.2 Procedury úvodního nastavení mikroskopů

Tyto procedury jsou používány pro korekci velkého rozladění typického při startu mikroskopu. Inicializační procedury jsou prováděny ve dvou fázích. Prvou je předběžné naladění mikroskopu ze stavu, kdy interference nemůže vzniknout. Tyto procedury jsou založeny na principu měření charakteristického rozměru seřizovací slony SC. Po ukončení procedur je poměrné zvětšení zobrazovacích větví mikroskopu $M \neq 1$, obrazy vzorku jsou ve výstupní rovině VR vůči sobě posunuty o $|\mathbf{q}_f| \neq 0 \mu\text{m}$ a rozdíl délek zobrazovacích větví $\Delta L \neq 0 \mu\text{m}$. Po úspěšném skončení první fáze následuje fáze druhá. Ve výstupní rovině jsou znatelné interferenční proužky a měřený holografický signál \bar{w}_D je dostačující k úspěšnému průběhu procedur druhé fáze, které jsou založeny na principu měření hodnot holografického signálu \bar{w}_D . Jeho hodnota je zesílena jeho maximální hodnotu na $\bar{w}_{D,max}$.

6.2.1 Prvá fáze úvodního nastavení

Prvá procedura zajistí, aby se poměrné zvětšení M obou zobrazovacích větví interferometru co nejvíce přiblížilo 1. Tato procedura se opět týká pouze FHM, protože CCHM zatím není vybaveno variabilní optikou. Princip metody je znázorněn na obrázku 9. Tato procedura je použita pro předběžnou korekci poměrného zvětšení M po spuštění mikroskopu. Aby mohla proběhnout, je třeba FHM přepnout do diaskopického modu, vzorek nahradit blankovým děličem a zvýšit časovou koherenci světla interferenčním filtrem obdobně jako v předchozí kapitole. Tím je eliminována možnost vysvěcení fluorescenčního vzorku a metoda je vhodná i pro reflexní aplikace FHM. Výsledná hodnota M



Obrázek 9: Vývojový diagram procedury první fáze úvodního nastavení FHM pro korekci poměrného zvětšení obou zobrazovacích větví interferometru M .

musí být v intervalu 0,95 až 1,05, protože v tomto rozmezí již matice měřených hodnot komplexní amplitudy $w_D(i, j)$ obsahuje dostatek vysokých hodnot holografického signálu (dle obrázku 7) pro úspěšný běh dalších justážních procedur. Na začátku procedury je seřizovací clona SC vsunuta do optické cesty mikroskopu a je zobrazena do objektové roviny VZ a také do výstupní roviny interferometru VR. Průměry obrazů SC d_1 a d_2 jsou rozdílné a jsou nalezeny zavřením příslušných závěrek Záv₃, Záv₄ v obrazových větvích interferometru. Průměry obrazů jsou odečteny z obrazu a porovnány mezi sebou

$$M = \frac{d_1}{d_2}. \quad (9)$$

Korekce rozdílného zvětšení je provedena změnou ohniska zoom objektivu Zoom₁. Rozsah změny ohniska činí 25 – 50 mm pro toto rozmezí je kalibrováno 100 % rozsahu pohybu servopohonu. Regulátoru servopohonu je pak odeslána nová procentuální hodnota daná součinem stávající hodnoty vynásobené M . Takto nastavený princip regulace je nezávislý na nastavení zvětšení ostatních zoom objektivů Zoom, protože změna jejich ohniska je

lineární vzhledem k nastavované procentuální hodnotě pohybu servopohonu. Tato sekvence se pro zvýšení jistoty správného nastavení zopakována a je ukončena podmínkou $0,95 < M < 1,05$. Následně je seřizovací clona SC vysunuta z optické cesty a závěrky Záv_{3,4} jsou otevřeny.

Následuje druhá procedura, která je založena na odečítání poloh obrazů seřizovací clony SC. U FHM mikroskopu probíhá procedura za stejných podmínek jako v předchozím případě. CCHM mikroskop běžně využívá interferenční filtr ke zvýšení časové koherence světla. Tato procedura je schopna obrazy zarovnat i při velkém rozladění mikroskopu a tím umožnit následné naladění interferenční struktury. Procedura je vhodná pro oba mikroskopy. Její princip je zachycen na obrázku 10. Cílem je pomocí mechanismu posuvu pole (objektiv O₂ CCHM mikroskopu a zrcadlo Z₉ FHM mikroskopu) nastavit mikroskop tak, aby vzájemný posuv polí $|\mathbf{q}_f| \approx 0 \mu\text{m}$ a tím byl dán dobrý předpoklad pro nalezení globálního maxima \bar{w}_D dle obrázku 4. Na začátku procesu je seřizovací clona SC vložena do optické cesty mikroskopu a tím je zobrazena do roviny vzorku VZ a tím také do výstupní roviny interferometru VR. Postupným snímáním oběma zobrazovacími větvemi jsou nalezeny středy obrazů $\text{SC}_1[x'_{\text{SC}_1}, y'_{\text{SC}_1}]$, $\text{SC}_2[x'_{\text{SC}_2}, y'_{\text{SC}_2}]$ a je vypočten vektor jejich vzájemného posuvu dle vztahu

$$\mathbf{q}'_f = (x'_{\text{SC}_1} - x'_{\text{SC}_2}, y'_{\text{SC}_1} - y'_{\text{SC}_2}). \quad (10)$$

Požadovaný posuv polí \mathbf{q}_f pak lze stanovit jako

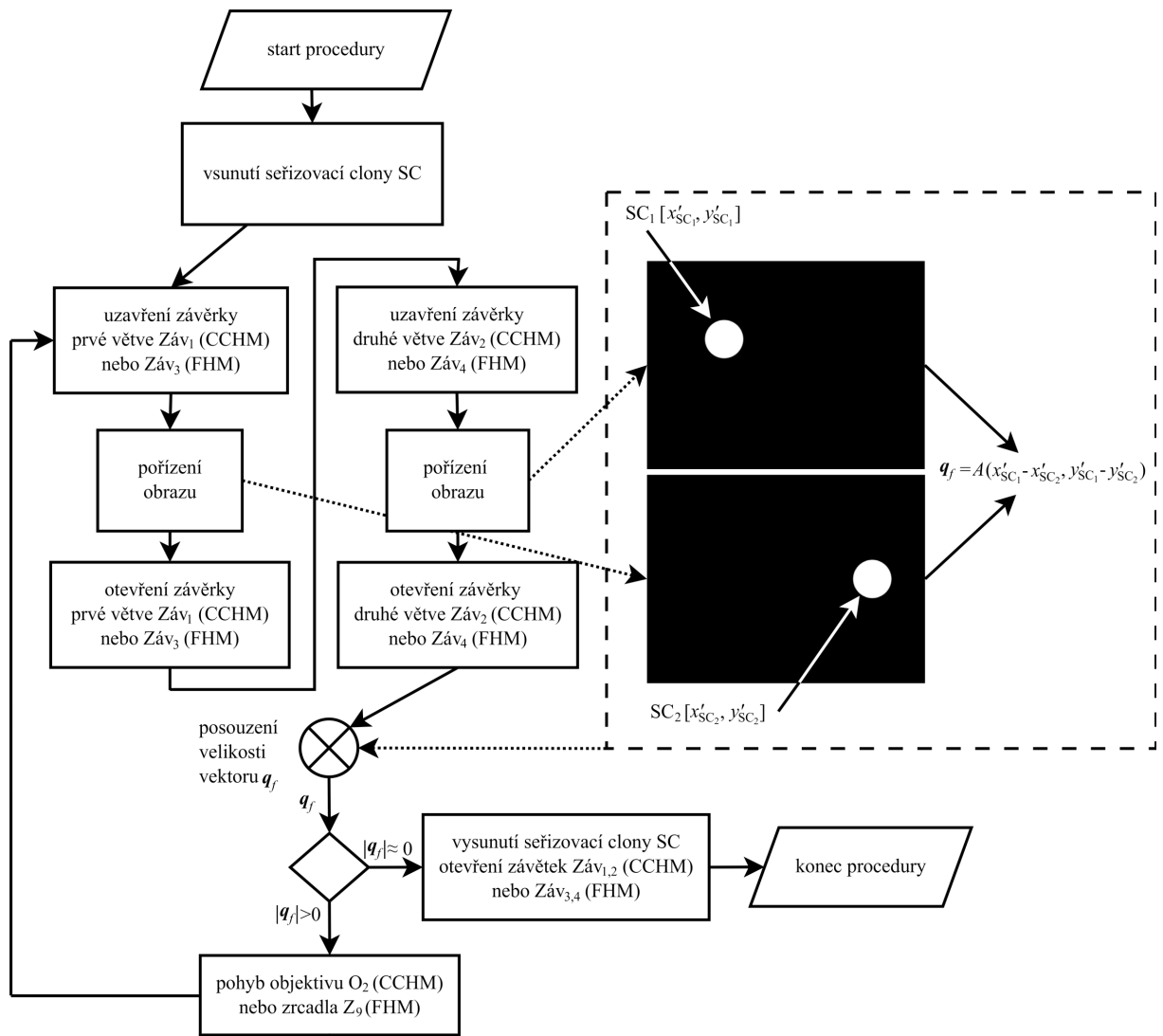
$$\mathbf{q}_f = A\mathbf{q}'_f = A(x'_{\text{SC}_2} - x'_{\text{SC}_1}, y'_{\text{SC}_2} - y'_{\text{SC}_1}), \quad (11)$$

kde A je zesílení procedury. To je zavedeno pro zjednodušení nastavení parametrů metody. Jeho vhodnou volbou lze pro všechny konfigurace nastavení zoom objektivů Zoom_{2,3,4} a výstupního objektivu VO₃ FHM zaručit iterační metodou to, že $|\mathbf{q}_f| \approx 0 \mu\text{m}$. Pro CCHM mikroskop s nevariabilní optikou je možno zvolit přesně parametr $A = \frac{1}{m}$, kde m je velikost zvětšení mezi objektovou a výstupní rovinou interferometru VR. Poté je pomocí mechanismu posuvu pole zavedena korekce posuvu polí $-\mathbf{q}_f$. Proces je opakován do té doby, dokud není docíleno podmínky, že výsledná hodnota $|\mathbf{q}_f|$ je menší než ekvivalent 10 pixelů snímaného obrazu. Následně jsou elementy SC, Záv₁, Záv₂ vysunuty z optické cesty mikroskopu.

Nakonec je nutno zkontrolovat, zda-li je hodnota měřeného holografického signálu \bar{w}_D větší než uživatelem stanovená minimální hodnota \bar{w}_D (přibližně 80 % z $\bar{w}_{D,max}$). Pokud tomu tak není, je nutno spustit proceduru, která po stanovených krocích mění ΔL . Tato procedura je shodná s procedurou druhé fáze úvodního nastavení. Pro tento účel stačí použít krok $10 \mu\text{m}$, díky kterému lze nalézt dle obrázku 4(c) až 90 % $\bar{w}_{D,max}$.

6.2.2 Druhá fáze úvodního nastavení

Tato procedura zajistí, aby poměrné zvětšení obou zobrazovacích větví interferometru bylo co nejblíže $M = 1$. Procedura se opět týká zatím pouze FHM, protože CCHM nemá variabilní optiku. Metoda je založena na principu hledání maxima. Jak je patrné z obrázku 7, pokud se $M \rightarrow 1$, přibývá v matici $w_D(i, j)$ vysokých hodnot holografického



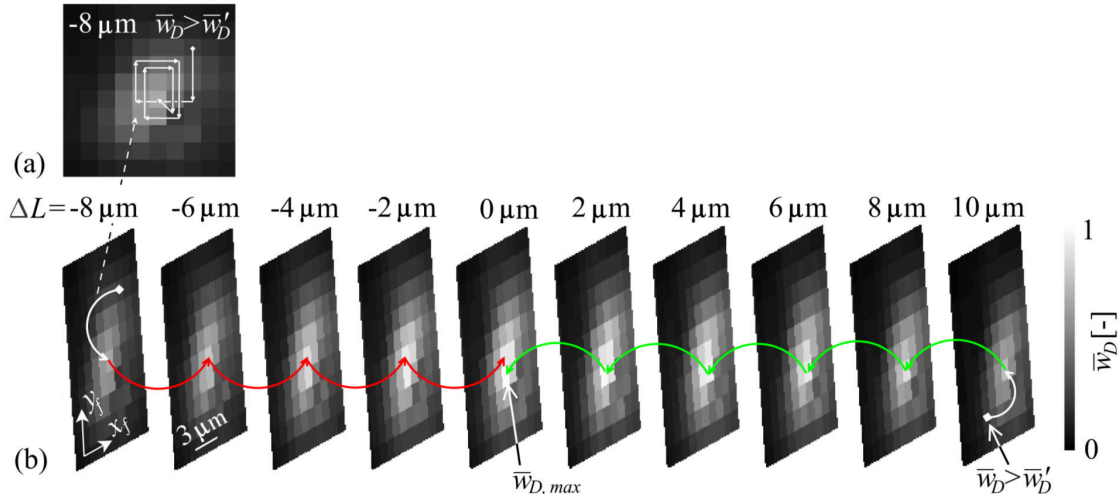
Obrázek 10: Vývojový diagram procedury první fáze úvodního nastavení CCHM a FHM pro korekci posuvu pole q_f .

signálu a tím roste měřený holografický signál \bar{w}_D . Proto je M po krocích měněno (změnou ohniskové délky zoomu Zoom_1) v definovaném rozmezí okolo své výchozí hodnoty. Při tom je průběžně odečítán měřený holografický signál \bar{w}_D . Ve výsledku je zoomovací objektiv Zoom_1 nastaven do polohy odpovídající nejvyšší hodnotě \bar{w}_D .

Další procedura slouží pro hledání nejvyšší hodnoty signálu \bar{w}_D změnou prvku, který posouvá obrazové pole (objektiv O₂ u CCHM mikroskopu a zrcátko Z₉ u FHM mikroskopu) s cílovým stavem $|q_f| = 0 \mu\text{m}$. To může být provedeno mnoha způsoby. Jednou z možností je dvourozměrné rastrování obrazovým posouvačem po drobných krocích kolem výchozí polohy (viz snímky na obrázku 11(b)). Toto je velmi jednoduchá a tím i robustní metoda. Druhou možností je uplatnit postup navržený Ing. Lukášem Kvasnicou, Ph.D., který využívá heuristický algoritmus s ukončovací podmínkou. Tento algoritmus je schématicky znázorněn na obrázku 11(a). Spočívá v těchto úkonech: Nejprve je odečtena hodnota signálu $\bar{w}_{D,1}$ ve vstupní pozici posouvače obrazového pole. Tato pozice q_f je

následně změněna o malý definovaný krok v libovolném směru a je získána nová hodnota signálu $\bar{w}_{D,2}$, která je porovnána s předchozí $\bar{w}_{D,1}$. Je-li $\bar{w}_{D,2} < \bar{w}_{D,1}$, algoritmus provede další krok vpravo vůči původnímu směru, jinak je proveden krok původním směrem. Když není ukončovací podmínka splněna, je odečtena hodnota signálu $\bar{w}_{D,3}$ a je znovu porovnána s předešlou hodnotou signálu $\bar{w}_{D,2}$. Ukončovací podmínka může být vybrána podle situace, která nastane dříve. Výhodně může být použita kombinace podmínek. Podmínky mohou být založeny na opakované detekci nejvyšší hodnoty signálu \bar{w}_D ve stejné pozici, když algoritmus opakovaně prochází stejnými souřadnicemi, nebo na kalkulaci variačního koeficientu z několika posledních hodnot signálu \bar{w}_D . Variační koeficient musí být blízký jedné, aby byla podmínka splněna. Heuristický algoritmus vyniká svou rychlostí, ale je náchylný k selhání z důvodů cyklického procházení malé množiny poloh. Rastrovací algoritmus vyniká svou jednoduchostí, nicméně je náročnější z časového hlediska.

Další procedura vede k nastavení nulového rozdílu délky větví, což odpovídá hodnotě $\Delta L = 0 \mu\text{m}$. Proto je pohybováno s prvky optické soustavy, které mění délku zobrazovací větve (zrcátko Z_2 u CCHM mikroskopu nebo osově výsuvy objektivů O a vzorku VZ u FHM mikroskopu). Nastavitelný interval pohybu je po krocích procházen a je hledána maximální hodnota signálu $\bar{w}_{D,max}$ (viz obrázek 11(b)).



Obrázek 11: Obrázek principů druhé fáze úvodního nastavení. Měřený holografický signál \bar{w}_D je normován a reprezentován stejně jako na obrázku 5. (a) Prvým v pořadí je heuristický algoritmus hledající lokální maximum hodnoty \bar{w}_D změnou \mathbf{q}_f při udržování konstantních hodnot ΔL a M . To je dáno příčnými pohyby mikroskopového objektivu O_2 mikroskopu CCHM a nebo zrcadlem Z_9 mikroskopu FHM. (b) Druhým v pořadí je hledání globálního maxima hodnoty $\bar{w}_{D,max}$ změnou ΔL pomocí osového pohybu zrcadla Z_2 mikroskopu CCHM nebo pomocí osových výsuvů objektivů O a vzorku SC mikroskopu FHM ve směru vzrůstajících hodnot \bar{w}_D . Hodnoty měřeného holografického signálu \bar{w}_D jsou normovány.

Poslední procedurou je nalezení správných osových poloh obou objektivů FHM mikroskopu, které odpovídají $\Delta z = 0 \mu\text{m}$. Nastavitelný interval pohybu je po krocích procházen a je hledána maximální hodnota signálu \bar{w}_D dle obrázku 8.

Postupné provedení všech čtyřech procedur zaručí, že všechny podmínky pro nalezení maximální hodnoty signálu $\bar{w}_{D,max}$ $M = 1$, $\Delta L = 0 \mu\text{m}$, $|\mathbf{q}_f| = 0 \mu\text{m}$ a $\Delta z = 0 \mu\text{m}$ jsou splněny. Pořadí těchto procedur je možno zaměňovat dle potřeby, případně i opakovat s použitím odlišných parametrů.

6.2.3 Testování procedur na CCHM mikroskopu

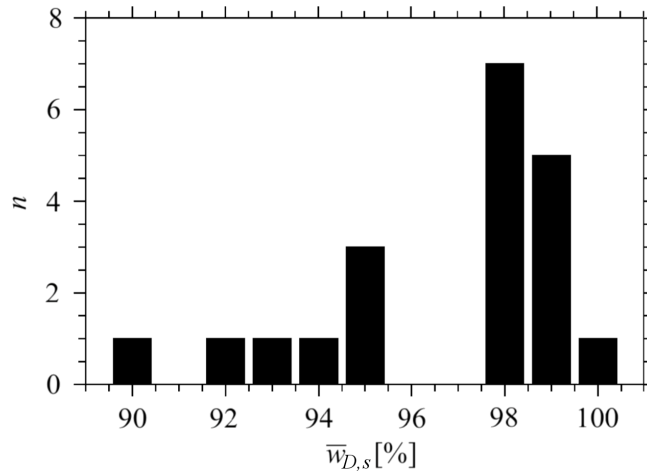
Pro testování procedur byly použity objektivy Nikon 10x/0,30. Širokospektrální plošný zdroj světla byl filtrován interferenčním filtrem FB650-10 ($\lambda = 650 \text{ nm}$, $\text{FWHM} = 10 \text{ nm}$). Hologramy byly zaznamenávány kamerou XIMEA MR4021MC-BH. Volba minimálních kroků pro justáž v příčném (\mathbf{q}_f) a osovém (ΔL) směru závisela na cílené hodnotě signálu podle grafu na obrázku 4(c). Jak je ukázáno v části 6.3, postačující hodnota signálu pro dobrou kvalitu kvantitativního fázového kontrastu je okolo 90 %. Odpovídající akceptovatelné rozladění je tedy $0,5 \mu\text{m}$ pro $|\mathbf{q}_f|$ a $10 \mu\text{m}$ pro ΔL (viz obrázek 4(c)). Proto byl vybrán krok zrcátka Z_2 $10 \mu\text{m}$ pro ΔL při první fázi úvodního nastavení. Pro druhou fázi úvodního nastavení byla vybrána robustní rastrovací metoda, která příčně rastrovala pole o velikosti 5×5 pozic s krokem $0,5 \mu\text{m}$ pro x_f a pro y_f . Jelikož je pohyb zrcátka Z_2 lineární a jednosměrný, byl osový krok ΔL byl zjemněn na $1 \mu\text{m}$. Tato korekce výrazně neprodloužila čas průchodu oproti situaci, kdyby byla použita na příčnou rastrovací metodu.

Testování metod pro CCHM bylo provedeno pro všechny použitelné metody společně, přičemž jednotlivé procedury na sebe plynule navazovaly. K testování byl použit originální SW firmy TESCANA ORSAY HOLDING pro CCHM, do kterého byly implementovány popsané metody. CCHM mikroskop byl opakovaně náhodně rozladován posuvem objektivu O_2 a pohybem zrcátka Z_2 o vzdálenost $100 \mu\text{m}$. Bylo provedeno dvacet nezávislých opakování kompletní justáže. Průměrná potřebná doba pro naladění mikroskopu byla okolo 136 sekund. Na obrázku 12 jsou ukázány výsledky automatizovaného seřizování v procentuálním porovnání k hodnotě získané při manuálním precizním naladění $\bar{w}_{D,max,m}$. Relativní hodnoty signálu $\bar{w}_{D,s} = (\bar{w}_{D,max}/\bar{w}_{D,max,m}) \cdot 100 \%$ jsou vyneseny na vodorovné ose x grafu. Na svislé ose y jsou vyneseny četnosti jednotlivých případů výsledného signálu. Je patrné, že testované procedury metody ladění skončily bezchybně s vysokou úspěšností.

6.2.4 Testování procedur na FHM mikroskopu

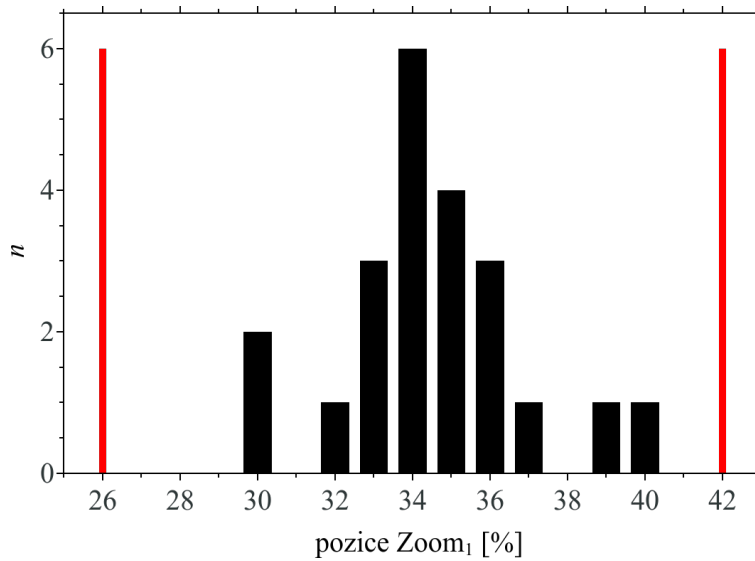
Pro testování procedur byly použity objektivy Nikon 10x/0,25. Pro úvodní fázi nastavení bylo místo fluorescenčního vzorku použito diaskopické osvětlení širokospektrálním plošným zdrojem světla, který byl filtrován interferenčním filtrem ($\lambda = 650 \text{ nm}$, $\text{FWHM} = 10 \text{ nm}$) a vzorek byl tvořen blánovým děličem světla. Hologramy byly zaznamenány kamerou Basler ACA2040-180km.

Úvodní procedura první fáze nastavení hledající stejné zvětšení $M \approx 1$ zobrazovacích větví byla testována tak, že ohnisko zoom objektivu Zoom_1 bylo nahodile měněno v intervalu 15 % až 60 % rozsahu pohybu servopohonu a následně byla spuštěna vlastní justážní procedura. Intervalu poměrného zvětšení $M = 1 \pm 0,05$ odpovídá reálně poloha servopohonu $34 \pm 8 \%$. Tyto hodnoty byly nalezeny ručně při kalibraci. Testování bylo



Obrázek 12: Histogram demonstrující celkovou úspěšnost při testování procedur na CCHM mikroskopu.

provedeno dvacetkrát. Na histogramu v obrázku 13 jsou zaznamenány četnosti jednotlivých výsledků justážní procedury společně s limity danými již zmíněným požadavkem. Jak vyplývá z vynesných dat, všechny výsledky justážní metody leží ve stanoveném intervalu. Metoda pracuje správně.



Obrázek 13: Histogram demonstrující úspěšnost při testování úvodní metody první fáze nastavení zvětšení $M \approx 1$. Červeně jsou vyznačeny hranice odpovídající intervalu $M = 1 \pm 0,05$.

Druhá procedura první fáze nastavení hledající vzájemný posuv polí $|\mathbf{q}_f| \approx 0 \mu\text{m}$ byla testována opět dvacetkrát. Po náhodné změně posuvu polí (cca max. 1/3 zorného pole) byla spuštěna justážní procedura. Všech dvacet opakování skončilo úspěchem a byla splněna podmínka pro ukončení metody.

Úspěch úvodních procedur první fáze nastavení je základním předpokladem pro úspěch procedur fáze druhé. V této fázi je již použit fluorescenční mód a vzorkem je již pozorovaný objekt. V tomto okamžiku je nutno změnou ΔL nalézt co nejvyšší hodnotu měřeného

holografického signálu \bar{w}_D . Metoda byla stejně jako u CCHM testována s krokem $1\text{ }\mu\text{m}$ pro ΔL . Metoda dvacetkrát procházela stanovený rozsah pohybu. Vždy určila výslednou polohu pro mechanismus změny délky větve odpovídající maximální hodnotě měřeného holografického signálu \bar{w}_D . Směrodatná odchylka výsledné polohy činila $0,38\text{ }\mu\text{m}$. To odpovídá $\Delta L = 0,76\text{ }\mu\text{m}$ a vzhledem ke tvaru grafu na obrázku 4(c) je to více než dostačující.

Obdobnou krokovou změnou je hledáno poměrné zvětšení obou zobrazovacích větví $M = 1$. Procedura procházela zvolený rozsah pohybu zoom objektivu Zoom_1 s krokem 1% . Výchozí oblastí bylo 26% až 42% rozsahu pohybu objektivu, tedy oblast, kde byla ukončena činnost úvodní procedury. Výsledný výsuv objektivu vždy odpovídal maximální hodnotě měřeného holografického signálu \bar{w}_D . Po dvaceti opakováních byla získána průměrná poloha výsuvu rovná $33,90\%$ s 95% intervalem nejistoty $\pm 2,13\%$, což odpovídá manuálně stanovené hodnotě. Je-li tento výsledek převeden na poměrné zvětšení M , je zřejmé, že procedura je spolehlivá, protože 95% interval spolehlivosti tvoří $M = 1,00 \pm 0,01$.

Robustní metoda procedury dvourozměrného rastrování byla použita i při hledání $|\mathbf{q}_f| = 0\text{ }\mu\text{m}$, která příčně rastrovala pole o velikosti 7×7 pozic s krokem $1,8\text{ }\mu\text{m}$ pro x_f a pro y_f . Velikost kroku byla volena tak, aby bylo zaručeno, že bude nalezena oblast maxima holografického signálu i pro výchozí hodnotu $|\mathbf{q}_f| = 6\text{ }\mu\text{m}$, která odpovídá podmínce 10 px pro ukončení úvodní metody. Procedura ve všech případech správně identifikovala oblast maxima holografického signálu, což bylo potvrzeno i manuálně.

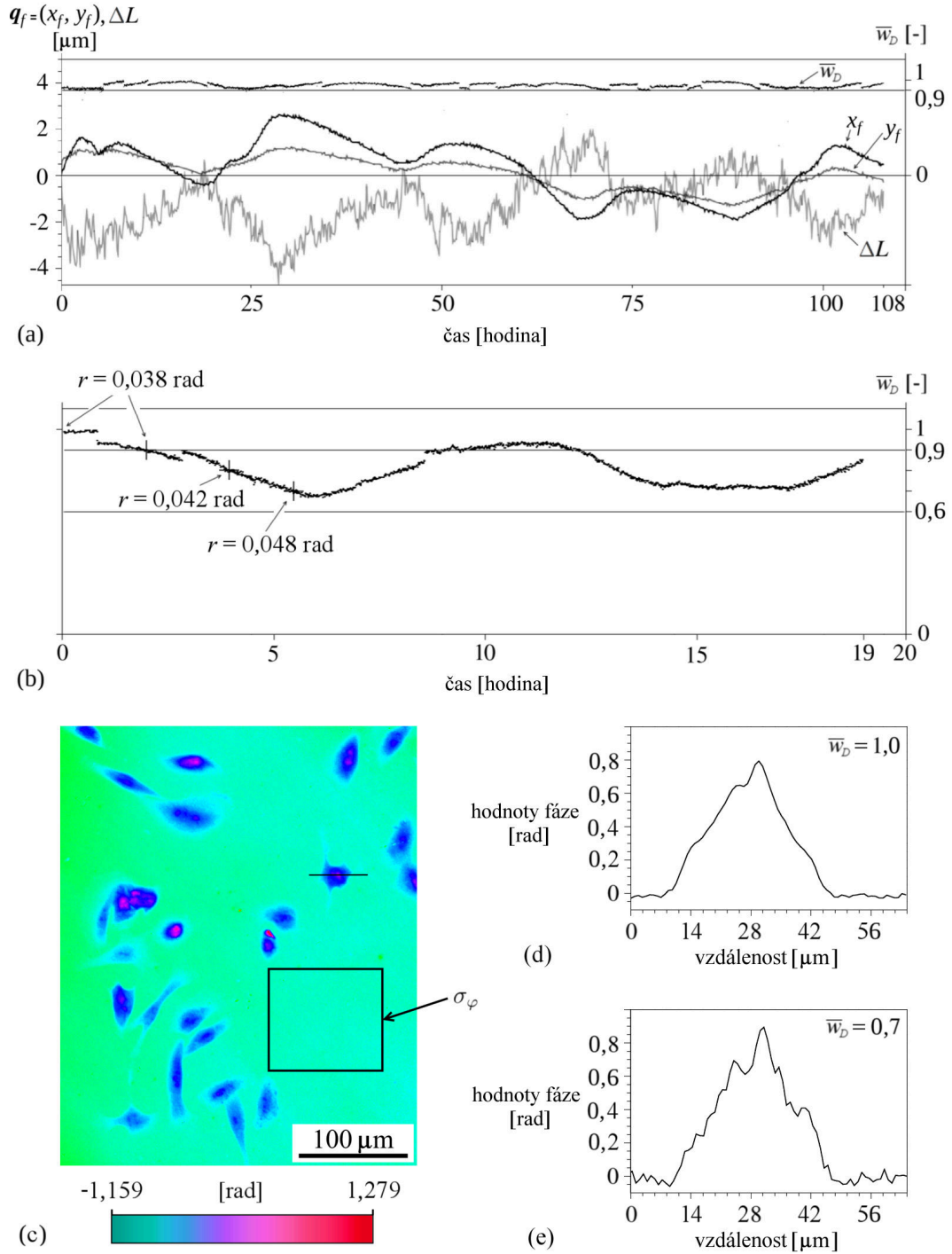
Poslední testovanou procedurou je doostření mikroskopových objektivů a tím i nastavení fokusu $\Delta z = 0\text{ }\mu\text{m}$. Procedura procházela zvolený rozsah pohybu obou mikroskopových objektivů O s krokem $1\text{ }\mu\text{m}$ kolem výchozí hodnoty stanovené při manuálním ostření po vložení vzorku. Metoda dvacetkrát procházela stanovený rozsah pohybu. Vždy určila výslednou polohu pro mechanismus posuvu objektivů O odpovídající maximální hodnotě měřeného holografického signálu \bar{w}_D . Výsledné polohy objektivů byly stanoveny s intervalem 95% spolehlivosti na $-24171,9 \pm 1,4\text{ }\mu\text{m}$ pro objektiv O_1 a $26435,1 \pm 1,8\text{ }\mu\text{m}$ pro objektiv O_2 (měřeno vůči referenčním nulovým pozicím lineárních stolků). Polohy byly potvrzeny manuálně. Z těchto hodnot a ze tvaru křivek grafu na obrázku 8 lze odvodit, že kraji intervalu 95% spolehlivosti pro méně příznivý případ ($1,8\text{ }\mu\text{m}$) odpovídá zanedbatelný pokles signálu.

6.3 Procedura pro dlouhodobé popzorování na CCHM mikroskopu

Při běhu dlouhotrvajících experimentů na CCHM mikroskopu hodnota signálu \bar{w}_D kolísá vlivem teplotních změn nebo vibrací. Proto je nutno nalézt proceduru, která by udržovala maximální hodnotu \bar{w}_D . Parametry, které je nutno ovlivňovat jsou: rozdíl optických délek ΔL a vzájemný posuvu obrazů ve výstupní rovině VR $\mathbf{q}_f = (x_f, y_f)$.

Navržená procedura aktivuje oba příčné stolky mikroskopového objektivu O_2 a osový pohyb zrcátka Z_2 . Těmito prvky je postupně pohybováno symetricky kolem jejich výchozích poloh o daný krok. Procedura porovnává výchozí hodnotu signálu $\bar{w}_{D,max}$ a hodnoty \bar{w}_D v přilehlých pozicích aktivního prvku. Aktivní element je vždy posunut do pozice

odpovídající maximální hodnotě signálu \overline{w}_D . Na obrázku 14(a) je uveden graf časové závislosti hodnot signálu \overline{w}_D během spuštěné procedury. Ta měnila pozice mikroskopového objektivu O_2 s krokem 100 nm ve směru x_f a y_f a optický dráhový rozdíl větve ΔL (pozice zrcadla Z_2) s krokem 200 nm. Velikosti kroků byly voleny jako nejmenší možné k získání přibližně konstantní hodnoty měřeného holografického signálu \overline{w}_D , ale stále postačující pro spolehlivou korekci rozladění mikroskopu vzniklou během intervalu 40 s mezi zásahy navržené procedury. Na obrázku 14(b) je vynesena časová závislost hodnot měřeného holografického signálu \overline{w}_D bez spuštěné procedury. Hodnota signálu není konstantní a je příliš nízká po většinu času. Pokles hodnot signálu se projevuje vyšším podílem šumu v kvantitativním fázovém obraze (QPI). Definujeme-li hodnotu rozlišení kvantitativní fáze pro QPI jako $r = 2\sigma_\varphi$, kde σ_φ je směrodatná odchylka šumu pozadí měřeného ve výřezu dle obrázku 14(c), pak pokles hodnot signálu na 90 % nemá měřitelný efekt na rozlišení (viz obrázek 14(b)). S klesajícími hodnotami signálu \overline{w}_D šum pozadí QPI σ_φ roste a tím se zhoršuje rozlišení QPI r . To je názorně ukázáno na řezech jednou z měřených buněk na obrázku 14(d) a (e).



Obrázek 14: (a) Příklad dlouhodobé stabilizace vysokých hodnot měřeného holografického signálu \bar{w}_D a současný průběh změn hodnot $\mathbf{q}_f = (x_f, y_f)$ a ΔL , které odpovídají posuvům objektivu O_2 a zrcadla Z_2 , a které vedly ke stabilizaci hodnot signálu. Hodnoty signálu \bar{w}_D jsou normovány. (b) Časová závislost hodnot signálu \bar{w}_D bez dlouhodobé udržovací procedury. Měřené fázové rozlišení r odpovídající daným hodnotám signálu je vyznačeno ve vybraných bodech grafu. (c) Kvantitativní fázový obraz krysích rakovinných buněk pořízených při 90 % maximální hodnoty měřeného holografického signálu ($r = 0,038$ rad, viz graf (b)). Měření hodnoty σ_φ je provedeno ve vyznačeném okně (22000 pixelů). (d) a (e) Řezy krysí rakovinnou buňkou pořízené při 100 % maximální hodnoty měřeného holografického signálu a 70 % maximální hodnoty měřeného holografického signálu. Řezy byly vedeny úsečkou vyznačenou v obrázku (c).

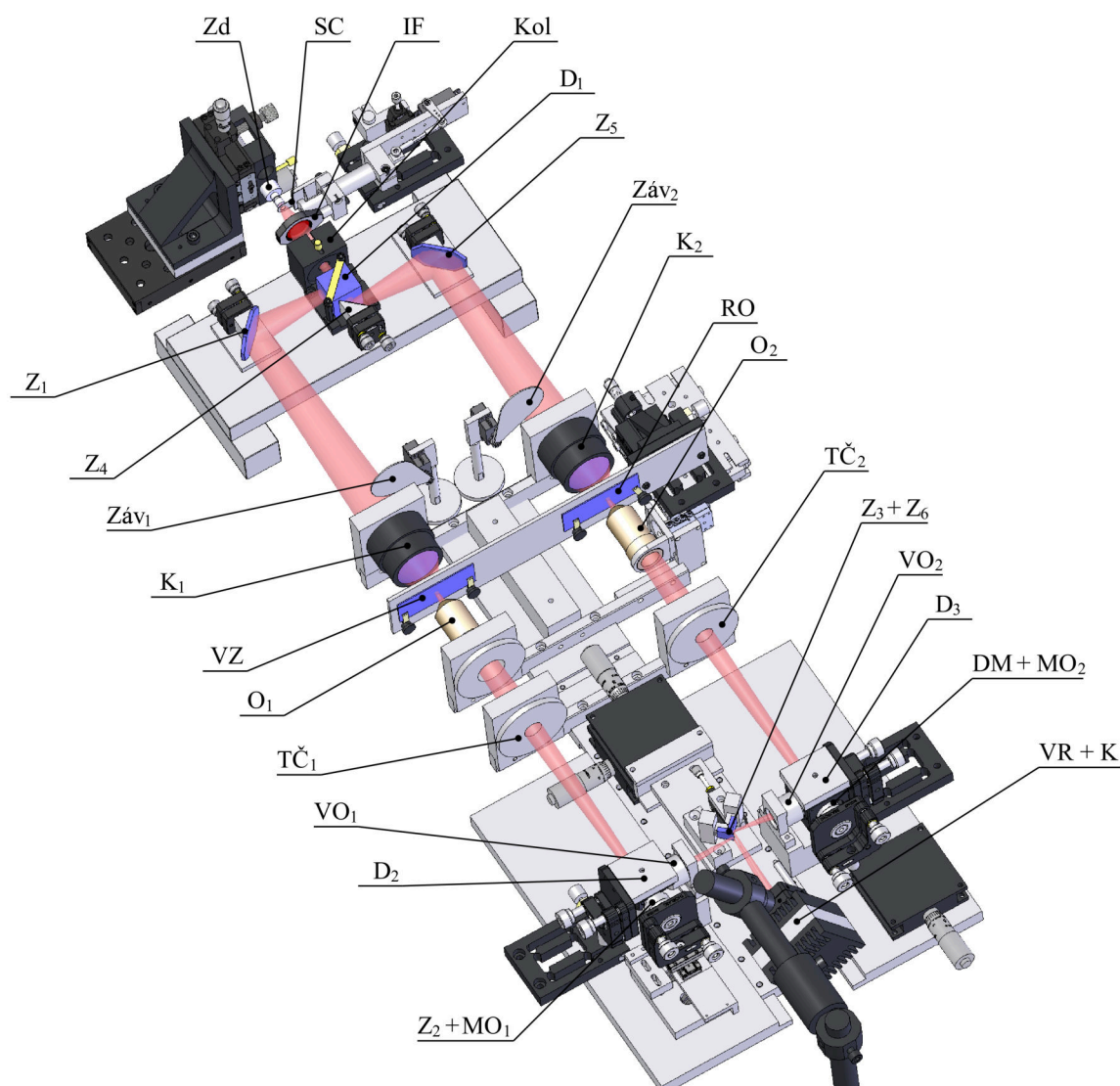
7 Konstrukce robotizovaných prvků

V minulé kapitole byly zmíněny všechny prvky, které jsou v obou mikroskopech nezbytné pro jejich řízení z PC. V této kapitole bude popsán mechanické řešení všech odpovídajících robotizovaných prvků obou mikroskopů, jejich řídicí elektronika i způsob komunikace s PC. Na obrázcích 15 a 16 jsou zobrazeny 3D modely obou mikroskopů a v nich jsou vyznačeny robotizované podsestavy. Mechanická sestava CCHM byla společně navržena mnou, Ing. Tomášem Slabým, Ph.D., a Ing. Martinem Antošem, Ph.D.. Konstrukce FHM vznikla v mé spolupráci s Ing. Pavlem Kolmanem, Ph.D. V obou případech jsem navrhoval robotické mechanismy včetně jejich řízení. V obou sestavách se vyskytují robotizované prvky poháněné servopohony firmy Hitec RCD USA [74] nebo HuiDa RC International [75] a mechanismy založenými na piezoposuvech firmy SmarAct [76]. Oba typy těchto prvků budou popsány v následujícím textu.

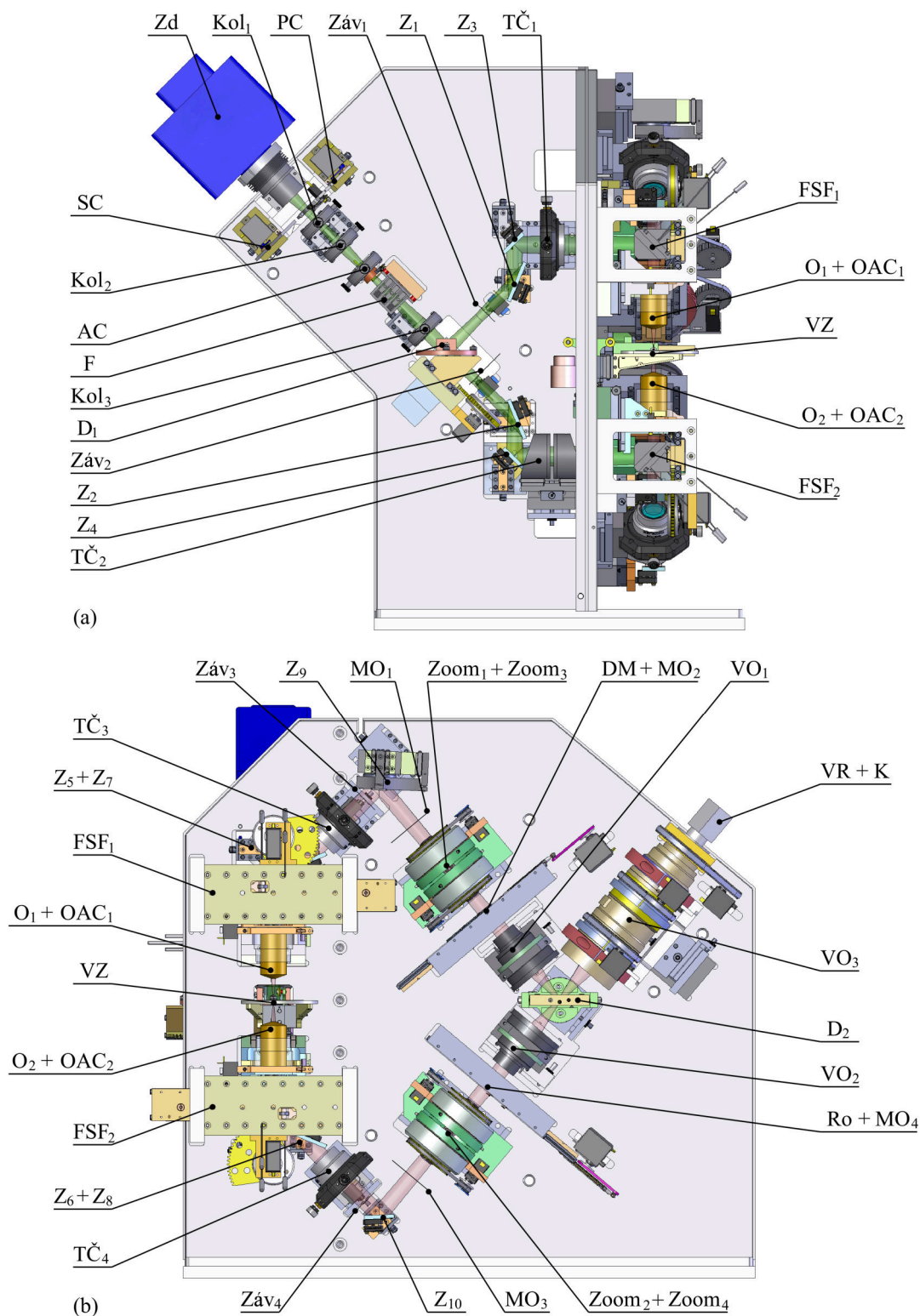
7.1 Robotizované prvky se servopohony

Všechny robotizované prvky jsou řízeny ze softwaru obslužného PC pomocí specializovaných řídicích karet. Byly voleny karty postačující požadavkům každého z mikroskopů. Protože přesnost robotizovaných prvků záleží i na typu použité řídicí karty, je důležité zmínit se o jejich řídicích možnostech.

Pro CCHM byla použita velmi jednoduchá karta SOS-AT od výrobce Snail Instruments [77] (viz obrázek 17(a)) s komunikačním rozhraním RS232, umožňující řídit až osm servopohonů. Karta je napájena pomocí dvou spínaných zdrojů s výstupním napětím 5 V. První zdroj napájí elektroniku karty (konektor U1) a druhý (konektor U2) je využit pro napájení servopohonů. Koncepce oddělených zdrojů je zvolena z důvodu odstranění rušení, které vzniká při pohybu servopohonů a které by mělo vliv na správnou funkci karty. Pomocí zkratovacích propojek lze na kartě nastavit komunikační rychlost karty - propojka B (2400 bit/s nebo 9600 bit/s), rozsah pohybu servopohonu - propojka R ($\pm 45^\circ$ nebo $\pm 90^\circ$). Tomu odpovídá i krok natočení servopohonu. Ten je dán nastaveným rozsahem pohybu, který je rozdělen na 256 logických úrovní. Je-li nastaven rozsah pohybu $\pm 45^\circ$, je krok natočení servopohonu $0,36^\circ$, a je-li nastaven rozsah pohybu $\pm 90^\circ$, pak je krok natočení servopohonu $0,72^\circ$. Pokud bychom využili méně standardní servopohon s atypickým rozsahem pohybu, museli bychom vhodně zvolit propojkou R výběr rozsahu pohybu servopohonu a ze softwaru zajistit, aby servopohon nedostával příkazy na polohy, na které se nemůže ze svých konstrukčních důvodů natočit. Deska pak podle zadané logické úrovně pro každý servopohon generuje signál s pulzně šířkovou modulací (PWM). Servopohon reaguje na změnu šířky pulzu a v něm umístěný servo-zesilovač jej převádí na napětí na motoru. Shoduje-li se aktuální výchylka servopohonu s požadovanou, servopohon zastaví pohyb a reguluje nastavenou výchylku do té doby, dokud se PWM modulace nezmění. Vztah velikosti natočení servopohonu s rozsahem pohybu $\pm 90^\circ$ na délce pulzu PWM modulace je patrný z obrázku 18. Komunikace s kartou je založena na zasílání číselného kódu o třech bytech. První byte je vždy 255 a je synchronizační. Druhý zadává číslo konektoru, na kterém je servopohon zapojen (S1 až S8) a pro tento případ nabývá



Obrázek 15: Optická sestava CCHM: Zd - zdroj světla, IF - interferenční filtr, SC - seřizovací clona, Záv - počítačem řízené závěrky, Kol - kolektor, Z - zrcadla, K - kondenzory, VZ - vzorek, RO - referenční objekt, MO - roviny meziobrazů, O - objektivy, TČ - tubusové čočky, DM - difrakční mřížky, D - dělič svazků, VO - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, K - CCD kamera (detektor).



Obrázek 16: Optická sestava FHM. (a) Osvětlovací část, (b) zobrazovací část. Zd - zdroj světla, PC - polní clona, SC - seřizovací clona, AC - aperturní clona, F - šedé filtry, Kol - kolektory, Záv - počítačem řízené závěrky, Z - zrcadla, VZ - vzorek, FSF - fluorescenční sestavy filtrů (excitační filtry, dichroická zrcadla, emisní filtry), OAC - aperturní clony objektivů, O - objektivy, TČ - tubusové čočky, MO - roviny meziobrazů, Zoom - zoomovací objektivy, DM - difrakční mřížky, Ro - referenční okénko, D - děliče svazků, VO - výstupní objektivy, VR - výstupní rovina, K - CMOS kamera (detektor).

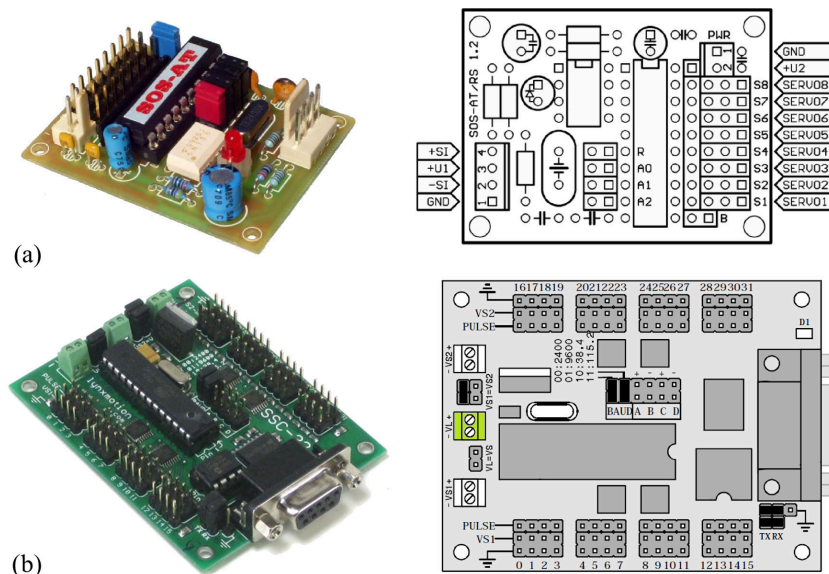
hodnot 0 - 7. Poslední třetí byte zadává výchylku natočení servopohonu (0 - 255). Tato karta, způsob ovládání servopohonů a tím i daná přesnost plně postačuje pro řízení robotizovaných prvků CCHM.

Uvedená karta však nedostačuje potřebám řízení servopohonů v mechanismech FHM, kdy je vyžadována vyšší přesnost. Proto byla použita karta SSC-32 od výrobce RobotShop [78]. Tato karta dovoluje přímo z obslužného SW nastavovat šíři pulzů PWM modulace, které jsou zasílány servopohonům. Tudíž s touto kartou jde pracovat na základní úrovni komunikace servopohonů. Je možno ovlivňovat rozsah natočení až na $\pm 90^\circ$ s nejmenším krokem v šířce pulzu $1 \mu\text{s}$ ($0,09^\circ$) a rychlost¹ s rozlišením $1 \mu\text{s/s}$, kde rychlost servopohonu je dle [78] definována takto: „Hodnota rychlosti $100 \mu\text{s/s}$ udává, že servopohon potřebuje 10 s k pohybu o 90° . Alternativně, hodnota rychlosti $2000 \mu\text{s/s}$ odpovídá hodnotě 500 ms pro vykonání pohybu 90° .“ Místo požadavku rychlosti je také možné zadat čas, za který se má otočení servopohonu provést. Karta také navíc umožňuje zasílání dat zpět do obslužného softwaru. Jde o informace o natočení servopohonů, status servopohonů jako celku (servopohony stojí nebo se alespoň jeden pohybuje), a také je zde možnost připojit na vstupy karty odporové snímače, které je možno vyčítat jak proporcionálně, tak i stavově (True/False). Karta dokáže obsluhovat až 32 servopohonů zapojených do výstupů (0 - 31), které jsou na okraji desky. Deska komunikuje s PC komunikačním rozhraním RS232 při výrobcem předepsané komunikační rychlosti 115200 bit/s . Obdobně jako u karty SOS-AT je i u této desky napájecí napětí děleno, a to do tří paralelních větví. Prvá větev je určena pro logické obvody desky a napájení je vedeno na svorky VL. Druhá a třetí větev jsou identické a slouží k napájení servopohonů (svorky VS1 a VS2). Na nich je stabilizováno napětí 5 V pomocí univerzálního regulátoru se spínaným napětím FOXY UBEC 3A, které kromě snížení napětí zdroje také odstraňují možná rušení způsobená motory servopohonů, aby nedošlo k poškození logických obvodů desky.

Mechanismy k zakládání seřizovacích clon SC a polní clony PC jsou zobrazeny na obrázku 19. Nosiče s clonami jsou vkládány pomocí šoupátkového mechanismu u CCHM a pomocí rotačních ramen u FHM. Se vsunutými clonami lze pohybovat ve třech osách, a tím ustavit a zaostřit její obrazy vytvářené optikou obou větví ve středu čipu detektoru K. Řízené pohyby šoupátkového mechanismu a rotačních ramen jsou vybaveny dorazy, na které jsou clony dotlačeny. Jako seřizovací clony SC byly použity ocelové plechy tloušťky 0,4 mm s otvorem o průměru cca 0,02 mm. Polní clonu tvoří irisová clona D12S od společnosti Thorlabs s maximálním průměrem 12 mm. Šoupátkový mechanismus CCHM je ustaven pomocí lineárního posuvu T12X/M od společnosti Thorlabs s rozsahem pohybu 12,7 mm a clona je ostřena vychýlením paralelogramu, který slouží jako základna mechanismu. Jako akční prvek tohoto mechanismu byl zvolen servopohon HS-125 MG firmy Hitec RCD USA s maximálním rozsahem pohybu $\pm 45^\circ$, s momentem $3,0 \text{ kg}\cdot\text{cm}$ a s maximální rychlostí² pohybu $0,17 \text{ s}/60^\circ$ při napájení 4,8 V. Sestava byla také doplněna interferenčním filtrem IF. Rotační ramena FHM jsou nesena zkříženými lineárními po-

¹Rychlost servopohonu lze řídit časovou změnou šířky pulzu PWM modulace. Jedná se o teoretickou hodnotu rychlosti ideálního servopohonu.

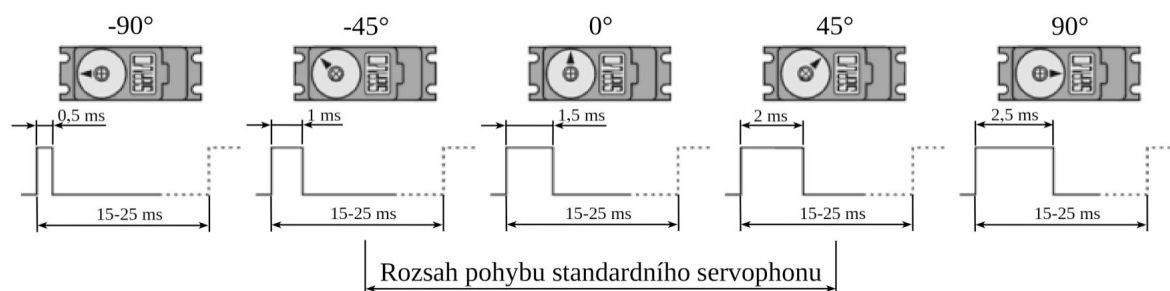
²Maximální rychlost servopohonů je výrobcí definována časem, který je potřebný pro vykonání definované velikosti rotačního pohybu. Tato veličina bude v práci používána.



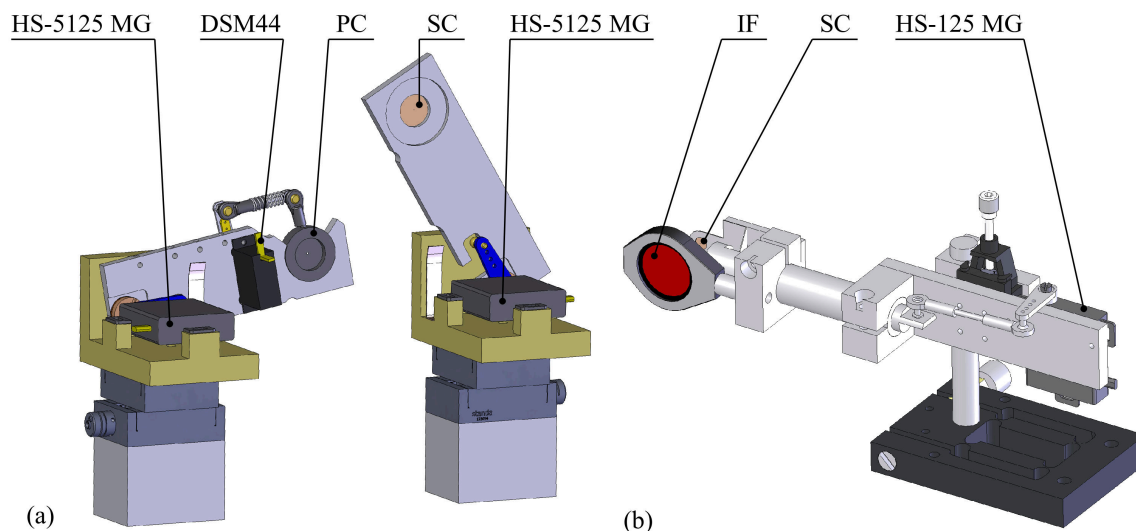
Obrázek 17: (a) Řídící karta SOS-AT. Zapojení konektorů: K U1 a U2 je přivedeno napájecí napětí měřené vůči zemi GND, $\pm SI$ - datové linky rozhraní RS232, B - komunikační rychlost, SERVO1 až SERVO8 - konektory servopohonů, R - rozsah pohybů servopohonů. Převzato z [77]. (b) Řídící karta SSC-32. Zapojení konektorů: VL - napájení desky, VS1 a VS2 - napájecí konektory pro servopohony, BAUD - komunikační rychlost, 0 až 31 - konektory servopohonů. Převzato z [78].

suvy 7T67-6-9SH137ML od společnosti Standa s rozsahem pohybu 6 mm. Ty dovolují ustavit ramena do vyžadované polohy a obraz clon zaostřit. Jako akční prvek tohoto mechanismu byl zvolen servopohon HS-5125 MG firmy Hitec RCD USA s maximálním rozsahem pohybu $\pm 45^\circ$, s momentem $3,0 \text{ kg}\cdot\text{cm}$ a s maximální rychlostí pohybu $0,17 \text{ s}/60^\circ$ při napájení 4,8 V. Oba typy servopohonů jsou vybrány tak, aby vždy vyvodily dostatečnou sílu proti dorazu robotizovaného pohybu. V případě CCHM je dorazem šroub na konci vedení šoupátkového mechanismu. V případě FHM ramena doléhají na dorazy umístěné v dílu držícího lampu. Aby servopohony nebyly přetěžovány a nemusel se vždy v softwaru měnit koncový bod pohybu servopohonu, je převod síly vždy nutno vést přes pružný element (pro FHM mikroskop) nebo jako v případě CCHM odpružit uložení servopohonu.

Mechanismy dovolující měnit průměr clon FHM jsou založeny na shodném principu (viz obrázek 19(a) a 20). Řiditelnou polní clonu PC a aperturní clonu AC tvoří irisové clony D12S od společnosti Thorlabs s maximálním průměrem 12 mm a objektivové aperturní clony OAC tvoří irisové clony D15S od společnosti Thorlabs s maximálním průměrem 15 mm. Polohování polní clony PC bylo popsáno v předešlém odstavci. Aperturní clony AC a OAC jsou polohovány pomocí dvou šroubů s protitlakem pružiny. Aperturní clona AC je nesena komerčním posuvem 5TLM-1TH od společnosti Standa s rozsahem pohybu 3 mm. Všechny clony jsou řízeny vysokorychlostními mikro-servopohony Power HD DSM44 firmy HuiDa. Tyto servopohony mají rozsah pohybu $\pm 60^\circ$, moment $1,2 \text{ kg}\cdot\text{cm}$ a maximální rychlost pohybu $0,09 \text{ s}/60^\circ$ při napájení 4,8 V. Kroutící moment servopohonů je táhly přenášen na páky irisových clon, které mají úhlový rozsah pohybu $\pm 45^\circ$. Převod je navržen



Obrázek 18: Vliv změny PWM modulace na velikosti natočení servopohonu. Převzato z manuálu výrobce karty [77].

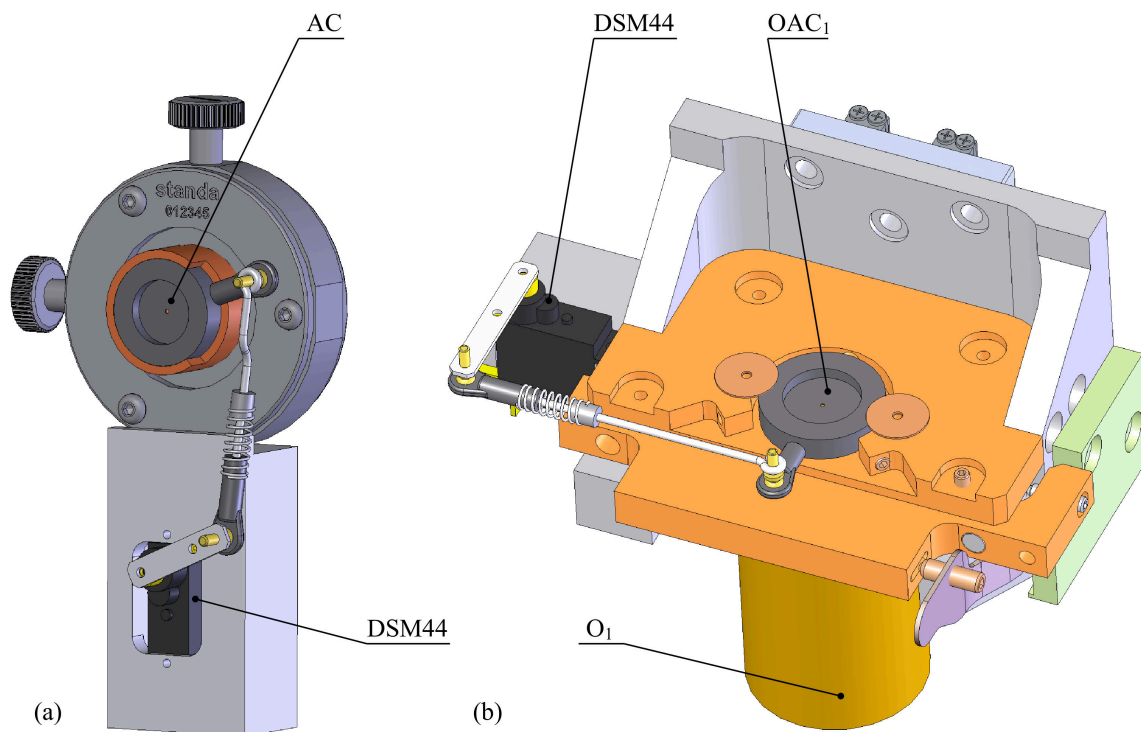


Obrázek 19: (a) Mechanismus k zakládání seřizovací clony SC FHM, (b) mechanismus k zakládání seřizovací clony SC CCHM: PC – polní clona, IF – interferenční filtr, SC - seřizovací clona, HS-125 MG, HS-5125 MG, DSM44 - servopohony.

tak, aby servopohony umožnily plné otevření i zavření clon. Přesnost těchto mechanismů je limitována výrobními vředy irisových clon.

Mechanismy závěrek jsou po konstrukční stránce velmi jednoduché a ani není vyžadována na jejich funkci vysoká přesnost servopohonu. Skládají se z nosiče servopohonu, vlastního servopohonu a závěrky. V mikroskopu CCHM jsou pro tento účel použity servopohony HS-5056MG firmy Hitec RCD USA s rozsahem pohybu $\pm 45^\circ$, s momentem $1,2 \text{ kg} \cdot \text{cm}$ a s maximální rychlostí $0,12 \text{ s}/60^\circ$ při napájení $4,8 \text{ V}$. Pro FHM mikroskop byly použity mikro-servopohony Power HD DSM44 firmy HuiDa.

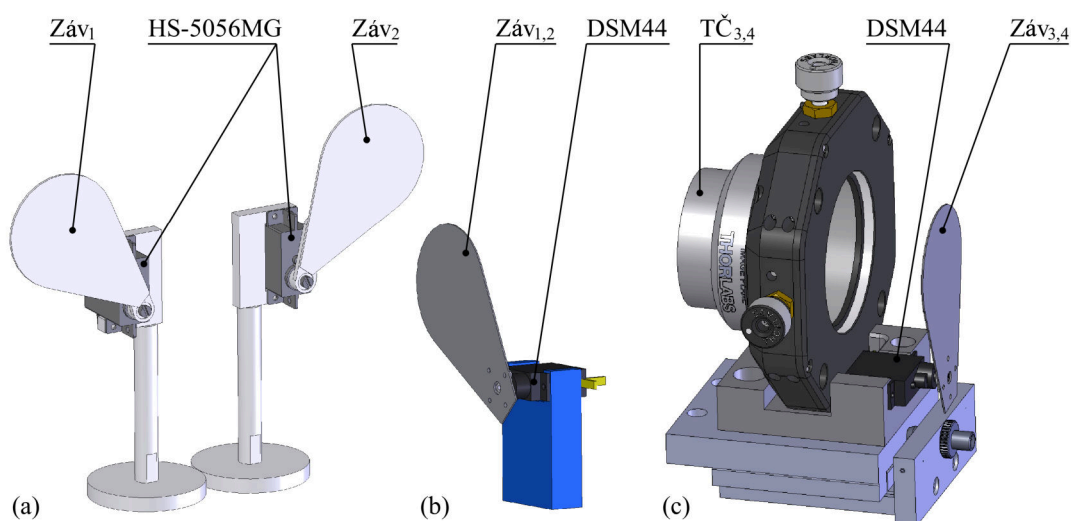
Oproti předchozímu případu je pro nastavování zvětšení FHM vyžadována vysoká přesnost. Zoom soustavy $\text{Zoom}_{1,3}$ a $\text{Zoom}_{2,4}$ (viz obrázek 22(a)) jsou navrženy pro změnu zvětšení v rozmezí $M \in \langle 1, 2 \rangle$. Tvoří je vždy pár objektivů Sony $16 - 50 \text{ mm } f/3,5 - 5,6$. Objektivy byly usazeny do centrovatelných nosičů s rozsahem pohybu $\pm 1 \text{ mm}$ a vybaveny osovým posuvem k ostření 7T125X-10 od společnosti Standa s rozsahem pohybu 10 mm . Servopohonem je měněno jejich ohnisko v rozmezí $f \in \langle 25, 50 \rangle \text{ mm}$. Jako akční



Obrázek 20: (a) Mechanismus k řízení aperturní clony AC FHM, (b) mechanismus k řízení aperturní clony objektivu OAC FHM: AC – aperturní clona, OAC – aperturní clona objektivu, O – mikroskopový objektiv, DSM44 – servopohon.

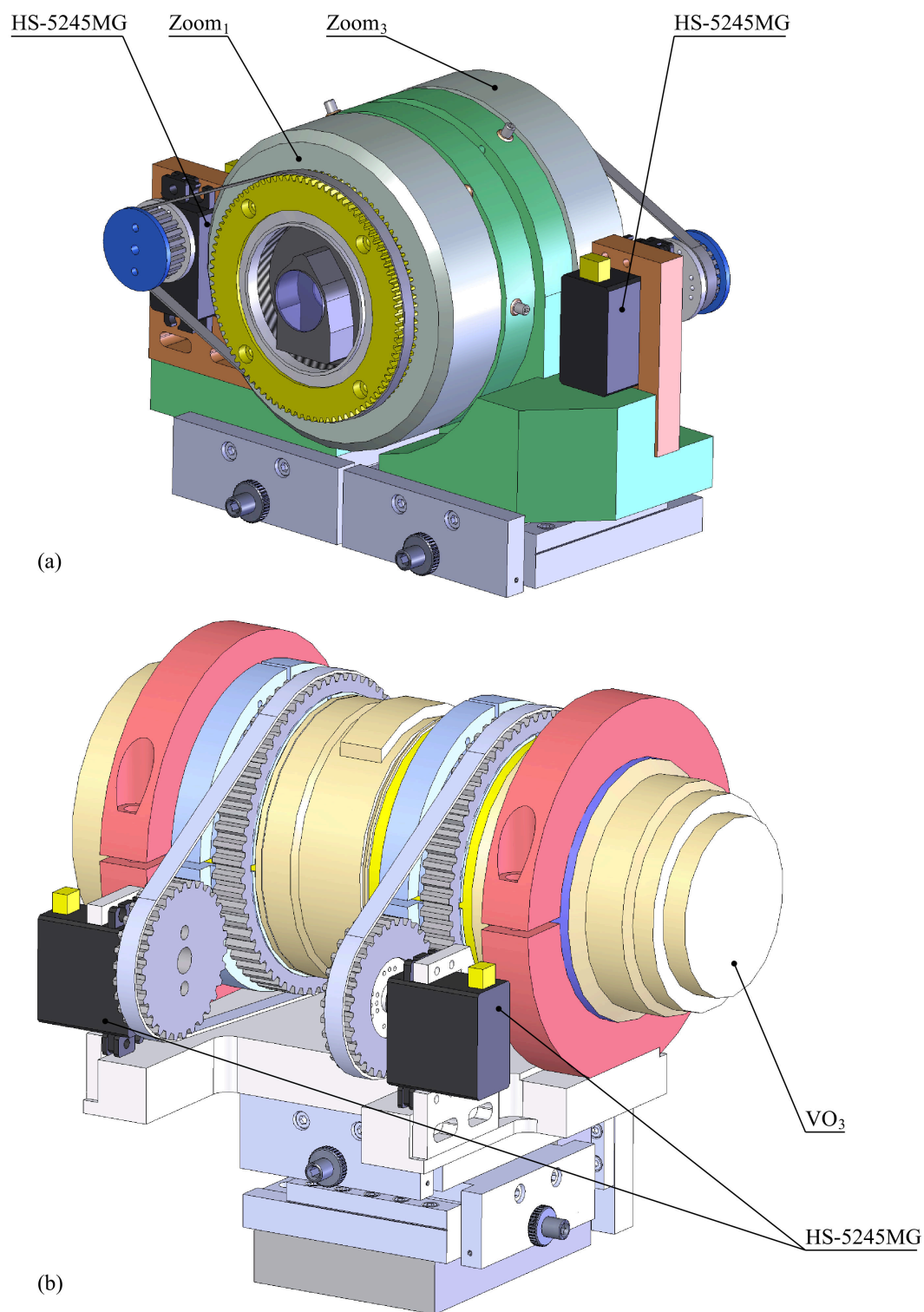
prvek byl zvolen programovatelný digitální servopohon HS-5245MG firmy Hitec RCD USA. Tyto servopohony mají maximální rozsah pohybu $\pm 90^\circ$, moment $4,4 \text{ kg}\cdot\text{cm}$ a maximální rychlost pohybu $0,15 \text{ s}/60^\circ$ při napájení $4,8 \text{ V}$. U tohoto typu servopohonu lze nastavit parametry (šířku pásma necitlivosti pro pulz PWM modulace, smysl a rychlost otáčení, polohu středu a velikost výchylek servopohonu). Servopohony byly shodně kalibrovány tak, aby pro zvolený převodový poměr měnily velikost ohniska objektivu dle zvoleného rozmezí. Tím je zaručen stejný chod všech čtyř objektivů. Stejné servopohony byly použity pro řízení výstupního objektivu VO_3 . Ten je tvořen fotografickým objektivem Canon EF 70-200 mm f 2,8 L USM neseným tříosým stolem složeným z lineárních posuvů 7T125X-10. Výstupní objektiv je možno nastavit v rozsahu ohnisek $f \in \langle 80, 200 \rangle \text{ mm}$. Tomu odpovídá díky převodovému poměru hnací soustavy plný rozsah pohybu servopohonu. Stejným převodovým poměrem je řešeno i doostření objektivu. Díky této robotizaci lze měnit zvětšení soustavy výstupních objektivů VO_1 a VO_3 (a také VO_2 a VO_3) v rozmezí $M \in \langle 1, 1,46 \rangle$. Podobný převodový mechanismus také slouží k rotaci kamery kolem optické osy. Tento mechanismus neslouží pro provedení justážní procedury, nýbrž k odstranění vadných pixelů kamery, kdy je možno průměrovat více snímku v různých natočeních kamery.

Posledním typem servopohony hnaných mechanismů jsou lineární výměníky. Ty slouží k přepínání fluorescenčních kanálů FHM mikroskopu. Každému fluorescenčnímu kanálu odpovídá jeden pár fluorescenčních kostek s fluorescenční sestavou filtrů FSF (obrázek

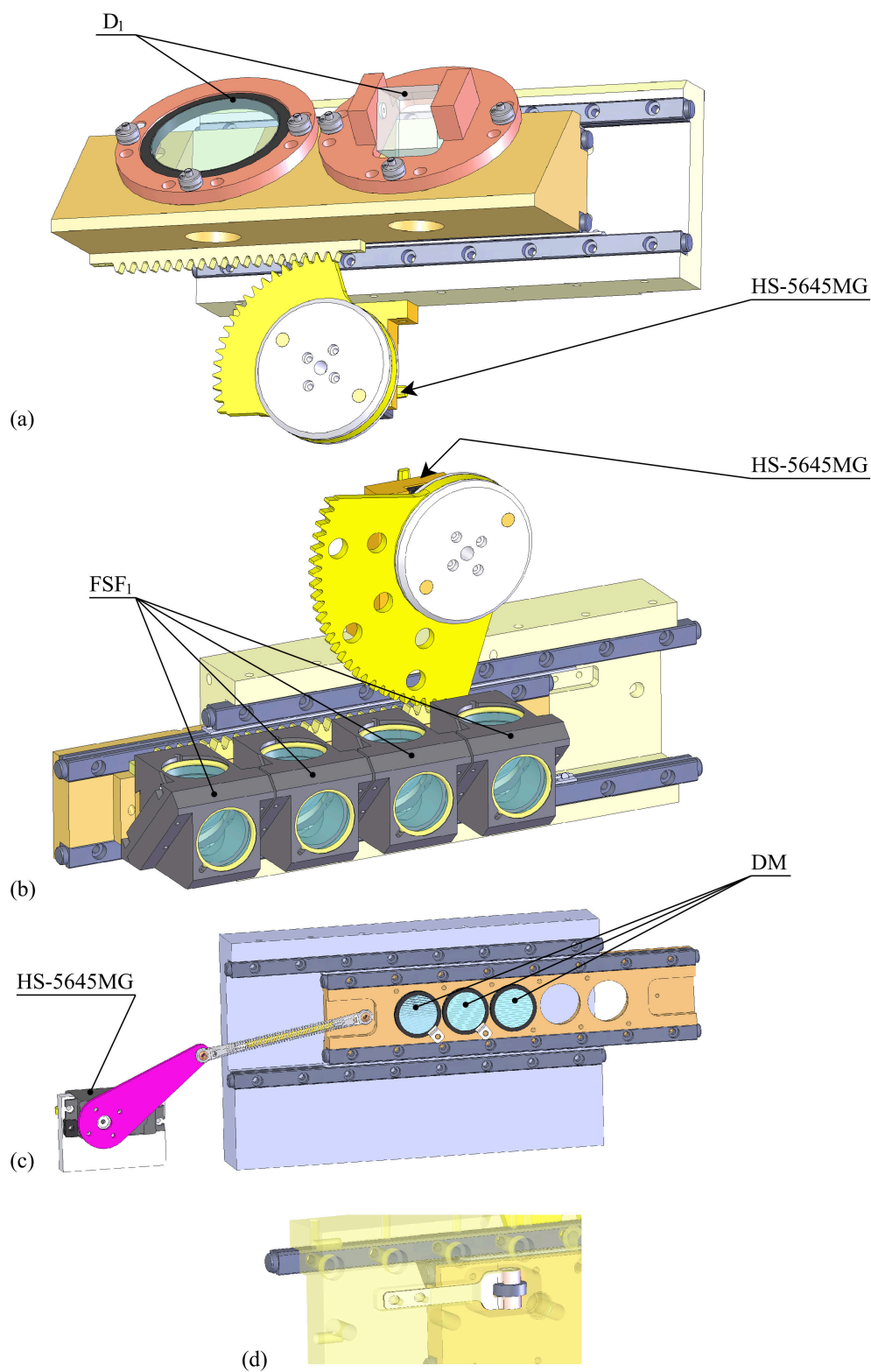


Obrázek 21: (a) Mechanismy závěrek $Záv_{1,2}$ CCHM, (b) mechanismy závěrek $Záv_{1,2}$ osvětlovací části FHM, (c) mechanismy závěrek $Záv_{3,4}$ zobrazovací části FHM: Záv - závěrky, TČ - tubusové čočky, HS-5056MG, DS44 - servopohony.

23(a)) a pro něj optimalizovaný pár difrakční mřížky DM s referenčním okénkem Ro (obrázek 23(b)). Protože pro všechny používané excitační vlnové délky nebyl nalezen vhodný dělič svazků D_1 se správnou spektrální propustností, bylo nutno vybavit mikroskop dalším výměníkem (obrázek 23(c)) umístěným v osvětlovací části mikroskopu. Tyto mechanismy se vyznačují podobnou konstrukcí. Pohyblivé lišty jsou vedeny v lineárním ložisku se zkříženými válečky LWR 3200 od firmy SKF s rozsahem pohybu 200mm. Na nich jsou umístěny optické komponenty. Lištami pohybují vůči základně výměníku servopohony. Jejich rotační pohyb je přenášen ozubeným převodem a klikovým mechanismem. Délka klik a poloměry ozubených kol jsou navrženy tak, aby servopohony svým rozsahem pohybu dokázaly přemístit optické komponenty v celém rozsahu pohybu výměníku. Pro pohon mechanismů je zvolen silný digitální servopohon HS-5645MG firmy Hitec RCD USA. Tyto servopohony mají rozsah pohybu $\pm 90^\circ$, moment 10,3 kg·cm a maximální rychlost pohybu 0,23 s/60° při napájení 4,8 V. Přesnost mechanismů je definována západkovým mechanismem (například obrázek 23(d)). Na pohyblivé liště jsou vytvořeny drážky, přes které přejíždí kladka (ložisko 6x12x4) přitlačovaná pružným elementem. Vůle v převodu servopohonu je využita tak, aby nebylo zabráněno samovolnému zacvaknutí kladky do drážky.



Obrázek 22: (a) Dva mechanismy ke změně zvětšení $\text{Zoom}_{1,2}$ FHM, (b) mechanismus ostření a změny zvětšení VO_3 FHM: Zoom - zoomovací objektivy, VO_3 - výstupní objektiv, HS-5245MG - servopohon.



Obrázek 23: (a) Mechanismus výměny dělice D_1 FHM, (b) mechanismus výměny fluorescenčních sestav filtrů FSF_1 FHM, (c) mechanismus výměny difrakční mřížky DM FHM, (d) západkový mechanismus mechanismů (a) - (c): D_1 - dělič svazků, FSF_1 - fluorescenční sestava filtrů, DM - výměnná difrakční mřížka, HS-5645MG - servopohon.

7.2 Robotizované prvky s lineárními stolky

Všechny tyto mechanismy jsou založeny na lineárních stolcích firmy SmarAct [76] a jsou řízeny specializovanými drivery téhož výrobce. Použité stolky se liší délkou posuvu, jinak mají většinu svých parametrů stejných:

- rychlost: max. 13 mm/s,
- minimální velikost kroku: 50 nm,
- rozlišení: méně než nanometr,
- maximální zádržná síla: 3 N.

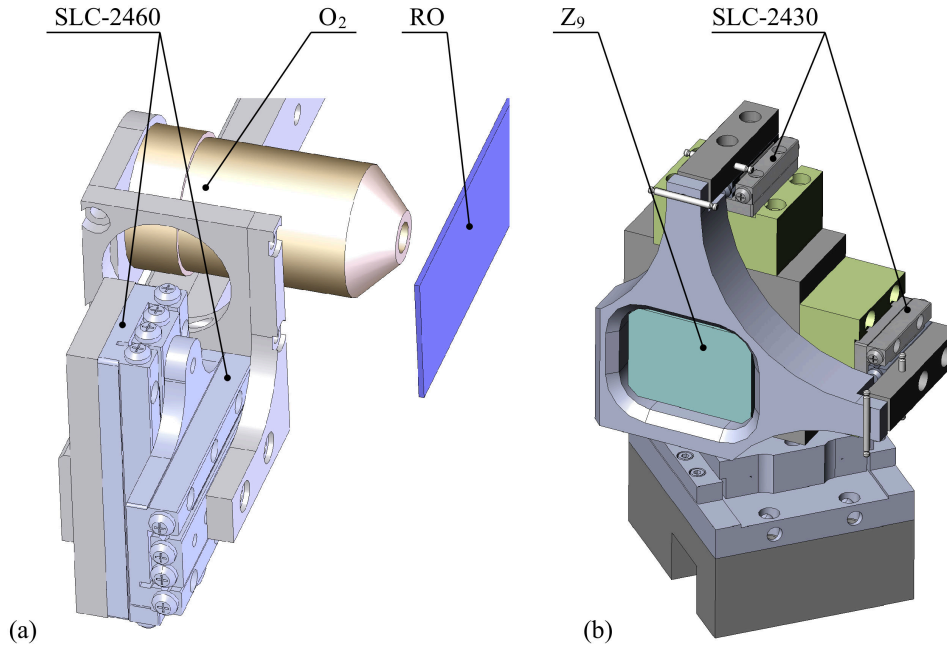
Parametry lineárních stolků plně postačují pro pohon seřizovacích mechanismů obou mikroskopů. Stolky lze plně řídit z obslužného PC. Drivery komunikují po sériové sběrnici USB (případně RS232). Pro komunikaci a veškerá nastavení je využito DLL knihovny obalené pro použití v LabView. Díky tomu je možno spustit kalibraci jejich optických senzorů, vyhledávání referenčních značek (zjištění fyzické polohy mechanismu), řídit jejich pozici, akceleraci i maximální rychlost.

Prvou aplikací těchto lineárních stolků jsou akční prvky měnící velikost \mathbf{q}_f . Změny této veličiny je možno dosáhnout dvěma způsoby. Lze buď příčně pohybovat vybraným optickým prvkem (objektiv O_2 u CCHM) nebo naklápět zrcadlo v zobrazovací části interferometru (zrcadlo Z_9 u FHM). Mechanismus pohybu objektivu O_2 je zobrazen na obrázku 24(a). Objektiv je nesen na odlehčeném rameni, které je upevněno na XY stolek složený z lineárních stolků SLC-2460. Takto upevněný objektiv se může pohybovat v obou směrech v rozsahu ± 17 mm. Mechanismus naklápění zrcadla Z_9 je znázorněn na obrázku 24(b). Zrcadlo se svým nosičem je uloženo v kloubovém ložisku s osovým stykem GX 17 F od firmy SKF [79] tak, aby střed rotace ložiska byl sjednocen se středem odrazné plochy zrcadla. Tím je zaručena rotace prvku bez parazitního posuvu. Nosič, kloubové ložisko a základna nosiče jsou společně staženy pružinou. Rotační pohyb je realizován dvěma lineárními stolky SLC-2430, jejichž výchylka je přenášena kuličkou na rotační pohyby ramen nosiče zrcadla. Kuličky jsou na straně lineárního stolku uloženy v kulových jamkách. Na straně s nosičem zrcadla jedna kulička doléhá tečně k povrchu kalené rovinné vložky nosiče a druhá je uložena v drážce s kalenými válcovými elementy. Takto utvořené klouby jsou stahovány pružinkami. Mechanismus dovoluje natočení zrcadla v rozsahu asi $\pm 0,5^\circ$. Pro lepší justáž mikroskopu je celý mechanismus uložen na lineární vedení 7T125X-10 od firmy Standa. Při návrhu je třeba zkontrolovat dosažitelné přesnosti nastavení obou typů mechanismů. Budeme-li uvažovat extrémní případ vyjdeme-li z použití modrého světla o vlnové délce $\lambda = 400$ nm a imerzního olejového objektivu s $NA = 1,3$, je mez rozlišení R dle Rayleighova kritéria [70] rovno

$$R = \frac{0,61\lambda}{NA} = \frac{0,61 \cdot 400}{1,3} \doteq 187 \text{ nm.} \quad (12)$$

Minimální krok $|\mathbf{q}_f|$ mechanismu nesoucího mikroskopový objektiv O_2 CCHM je dán přímo minimální velikostí kroku lineárních stolků (50 nm), který je výrazně menší než nejmenší možná rozlišovací mez objektivu R . Pro určení minimálního kroku mechanismu

nesoucího zrcátka Z_9 FHM je nutno postupovat odlišně, vzhledem k umístění justážního zrcátka. Minimální velikosti kroku lineárních stolků odpovídá posun meziobrazu MO_1 za tubusovou čočkou TČ₃ o 67 nm. Vztáhneme-li tuto hodnotu vůči běžně dostupným objektivům, pak pro objektiv s nejmenším zvětšením 4x (s největším zvětšením 100x) je možno posun MO_1 přepočíst do roviny vzorku SC a dosáhnout kroku $|q_f| = 16,75$ nm ($|q_f| = 0,67$ nm). To je mnohonásobně méně, než jsou příslušná rozlišení R těchto objektivů. Oba mechanismy jsou schopny zajistit přesné seřízení mikroskopů.

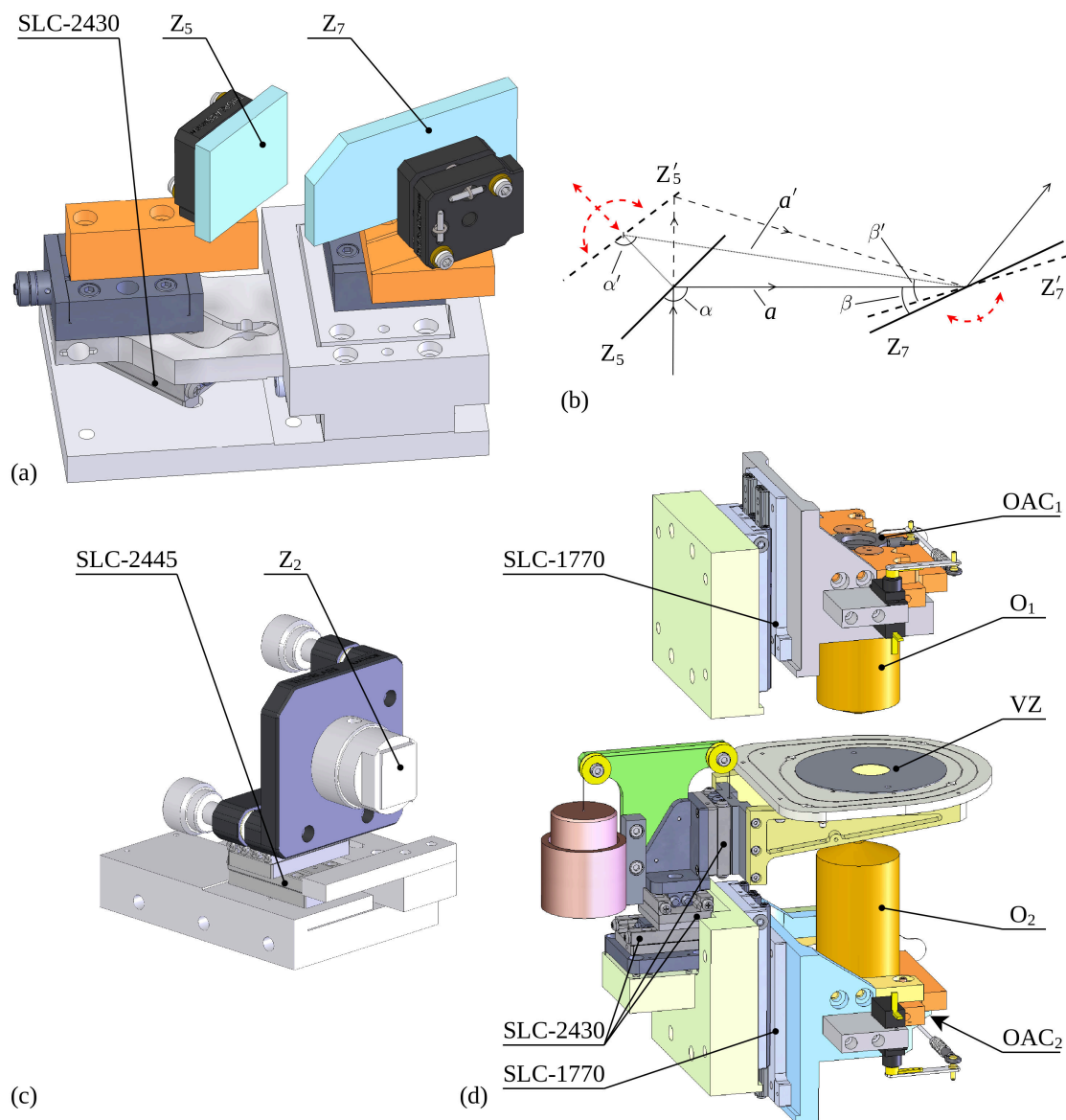


Obrázek 24: (a) Mechanismus měnící posunutí q_f příčným pohybem objektivu O_2 CCHM, (b) mechanismus měnící velikost q_f náklonem zrcadla Z_9 u FHM: O_2 - mikroskopový objektiv, RO - referenční objekt, Z_9 - zrcadlo, SLC-2460, SLC-2430 - lineární stolky.

Další aplikací těchto lineárních stolků jsou akční prvky měnící ΔL . U CCHM mikroskopu je tohoto efektu dosaženo mechanismem určeným k pohybu zrcátka Z_2 , který je znázorněn na obrázku 25(c). Sestava využívá lineárního stolku SLC-2445 a dovoluje pohyb zrcátka ve směru optické osy. Rozsah umožněné změny délky větve $\Delta L = \pm 20$ mm s nejmenším krokem $\Delta L = 100$ nm. Pohyb zrcátka je na jedné straně omezen mechanickým dorazem, aby nedošlo k poškození děliče svazků D_2 . U FHM mikroskopu jsou tři již zmíněné možnosti, jak měnit optickou délku zobrazovacích větví. Prvou je mechanismus výsuvu a rotace zrcátka Z_5 a s ním vázaná rotace zrcátka Z_7 viz obrázek 25(a). Princip kinematiky mechanismu je znázorněn na obrázku 25(b). Mechanismus je vykreslen v poloze středové a v poloze vychýlené (čárkované). Odsune-li lineární stolek zrcátko Z_5 do polohy Z'_5 , dojde k prodloužení vzdálenosti a na a' . Přitom úhly vyznačené na obrázku zůstávají neměnné a platí $\alpha = \alpha'$ a $\beta = \beta'$. Tím také dochází k rotaci zrcátek Z_5 a Z_7 , přičemž zrcátko Z_7 rotuje kolem pevného bodu. Tohoto principu je využito při konstrukci. Konstrukční prvky, umožňující měnit vzdálenost a (a'), jsou vybaveny pružnými klouby, jejichž osa rotace je pomocí manuálních stolků 7T67-6-9SH137ML od firmy Standa sjed-

nocena s odraznou površkou zrcadel. Tyto prvky jsou v sobě uloženy pomocí lineárního vedení LWR 3050 od firmy SKF. Rozsah umožněné změny délky větve $\Delta L = \pm 2,65$ mm s nejmenším krokem $\Delta L = 70$ nm. Druhou možností změny délky větve je totožný mechanismus v osvětlovací části mikroskopu, který pohybuje zrcadly Z_2 a Z_4 . Poslední možností je společný osový pohyb mikroskopových objektivů $O_{1,2}$ a osový pohyb mikroskopového stolku se vzorkem VZ (viz obrázek 25(d)). Tato možnost dovoluje měnit délku větví jak v osvětlovací tak i v zobrazovací části. Oba objektivy jsou kvůli vyšší zátěži neseny zdvojeným lineárním stolkem SLC-1770, který je předeprnut pružinami. Mikroskopovým stolkem pohybuje trojice lineárních stolků SLC-2430. Všechny tyto stolky umožňují změnu délky větve $\Delta L = \pm 8$ mm s nejmenším krokem $\Delta L = 100$ nm. Přesnosti i rozsahy pohybů mechanismů plně dostačují k seřízení obou mikroskopů, protože jsou menší než je koherenční délka bílého světla, která je například pro halogenovou lampu dána asi $1\text{ }\mu\text{m}$ [80].

Posledními aplikacemi lineárních stolků jsou osově výsuvy dvou částí tubusové čočky $T\check{C}_{2a,2b}$, které jsou určeny pro ladění stojaté vlny mezi mikroskopovými objektivy $O_{1,2}$ FHM mikroskopu (viz obrázek 16).



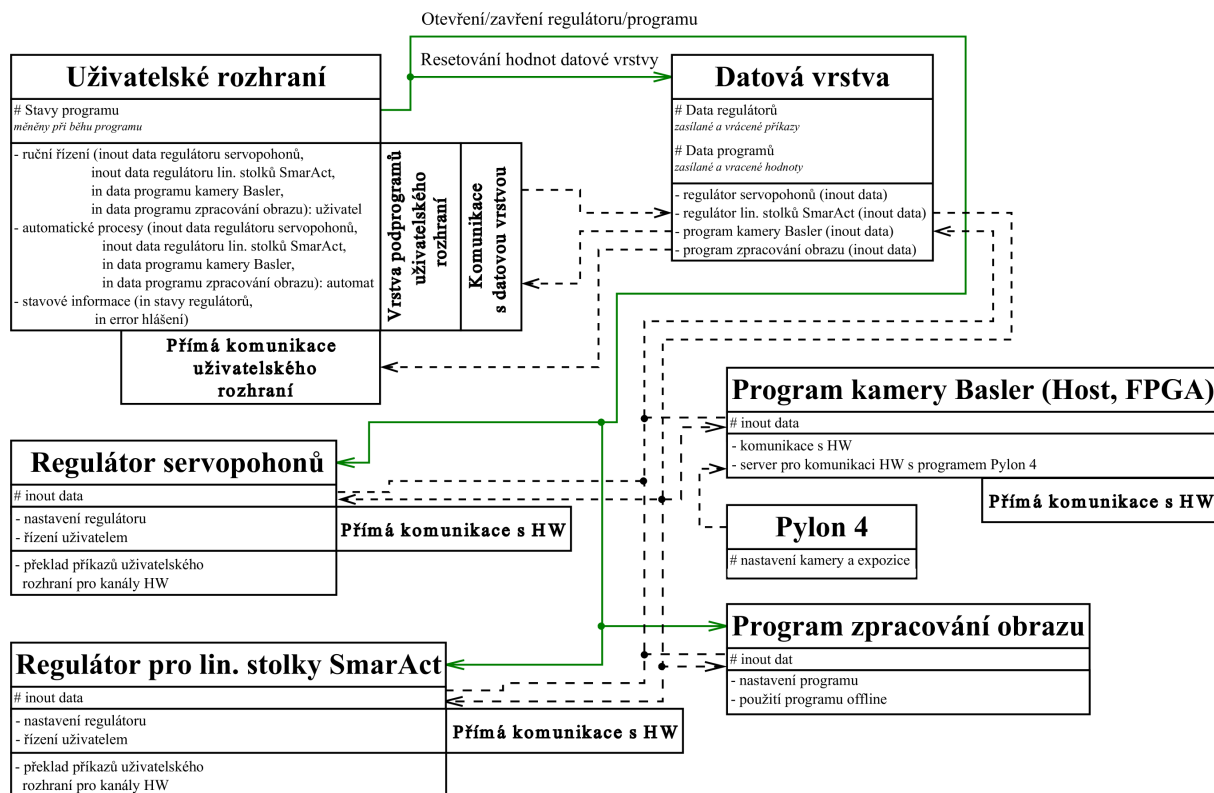
Obrázek 25: (a) Mechanismus FHM měnící délku větve ΔL výsuvem s rotací zrcátka Z_5 a vázanou rotací zrcátka Z_7 , (b) kinematické schéma mechanismu (a) (čárkovaná čára značí vychýlenou polohu), (c) mechanismus určený k pohybu zrcátka Z_2 u CCHM, (d) - mechanismy FHM pro společný osový pohyb mikroskopových objektivů $O_{1,2}$ a osový pohyb mikroskopového stolku se vzorkem VZ : O - mikroskopové objektivy, Z - zrcadla, OAC - aperturní clony objektivů, VZ - vzorek, SLC-2445, SLC-2430, SLC-1770 - lineární stolky.

8 Software pro řízení Fluorescenčního holografického mikroskopu

Z požadavků na řízení a funkci FHM, konstrukce optické soustavy, druhu použitých akčních prvků, jejich kontrolérů a komunikace přímo vyplývají požadavky na software mikroskopu. Konkrétně je nutné programově ovládat servopohony, lineární stolky SmarAct, získávat obrazová data (hologramy) z kamery a ty následně zpracovat, analyzovat a ukládat. Klíčovou otázkou je architektura softwaru, která musí zaručit, že bude co nejvíce modulární. Jednotlivé jeho části musí být funkčně nezávislé. Paralelita procesů všech částí je důležitá pro jejich nezávislost. Podrobné schéma softwaru vytvořeného v prostředí Lab-View včetně výpisů komunikačních řetězců je součástí přílohy práce. Toto programovací prostředí bylo zvoleno z důvodu možnosti rychlé tvorby programu. Navíc obsahuje ucelené nástroje pro programování hradlového pole grabberu kamery. Zjednodušené schéma softwaru je uvedeno na obrázku 26. Software se skládá z programů základní vrstvy, které komunikují s hardwarem (regulátor servopohonů, regulátor lineárních stolků SmarAct a program pro obsluhu kamery Basler), a programu, který zpracovává hologramy. Pro uživatele pracujícího s mikroskopem je určen frontální program (program uživatelského rozhraní) a program Pylon 4 dodávaný společně s kamerou. Z požadavků nezávislosti a modularity programů vyplývá požadavek na komunikaci mezi programy. Navíc lze každou část softwaru lze nastavit tak, aby běžela na svém vlastním vlákne procesoru. Proto byla vytvořena datová vrstva, která dovoluje vyměňovat si data mezi programy základní a frontální vrstvy. Data jsou do ní zapisována a z ní vyčítána ve formě textových řetězců, logických proměnných, číselných hodnot a polí. To dovoluje svobodnou výměnu dat mezi jednotlivými částmi softwaru. Tato nezávislost také dovoluje provést jednoduše všechna nastavení programů, testování a ladění.

8.1 Program uživatelského rozhraní

Program uživatelského rozhraní slouží k ovládání celého mikroskopu uživatelem a také se stará o řízení běhu celého softwaru. Uspořádání frontálního panelu programu uživatelského rozhraní je zřejmé z obrázku 27. Architektura programu je založena na principu konečného stavového automatu, který disponuje třemi stavy. Prvým z nich je inicializace. Při ní dochází k resetování hodnot datové vrstvy a ke spuštění programů základní vrstvy v jejich automatickém módu (viz další text). Oba regulátory se spustí a dochází k jejich vlastní inicializaci. Jsou-li oba regulátory připraveny, odesílají informaci o svém statusu přes datovou vrstvu uživatelskému rozhraní. Posledním krokem inicializace je přenastavení pozic lineárních stolků do výchozích hodnot. Druhý stav tvoří v programu uživatelského prostředí smyčku, při jejímž běhu se postupně kontrolují hodnoty požadovaných veličin a porovnávají se s těmi, které jsou v registru smyčky uloženy jako stávající. Je-li zjištěna změna, odesílá se příkaz příslušnému regulátoru a po jeho splnění dojde k přepsání registru smyčky. Pro zjednodušení kódu a jeho používání i při automatických procedurách byly některé kontroly zabaleny do vrstvy podprogramů. Jedná se o vázané pohyby lineárních stolků pro posuv pole \mathbf{q}_f PP, změna délky větve ΔL pomocí vázaného pohybu mikrosko-



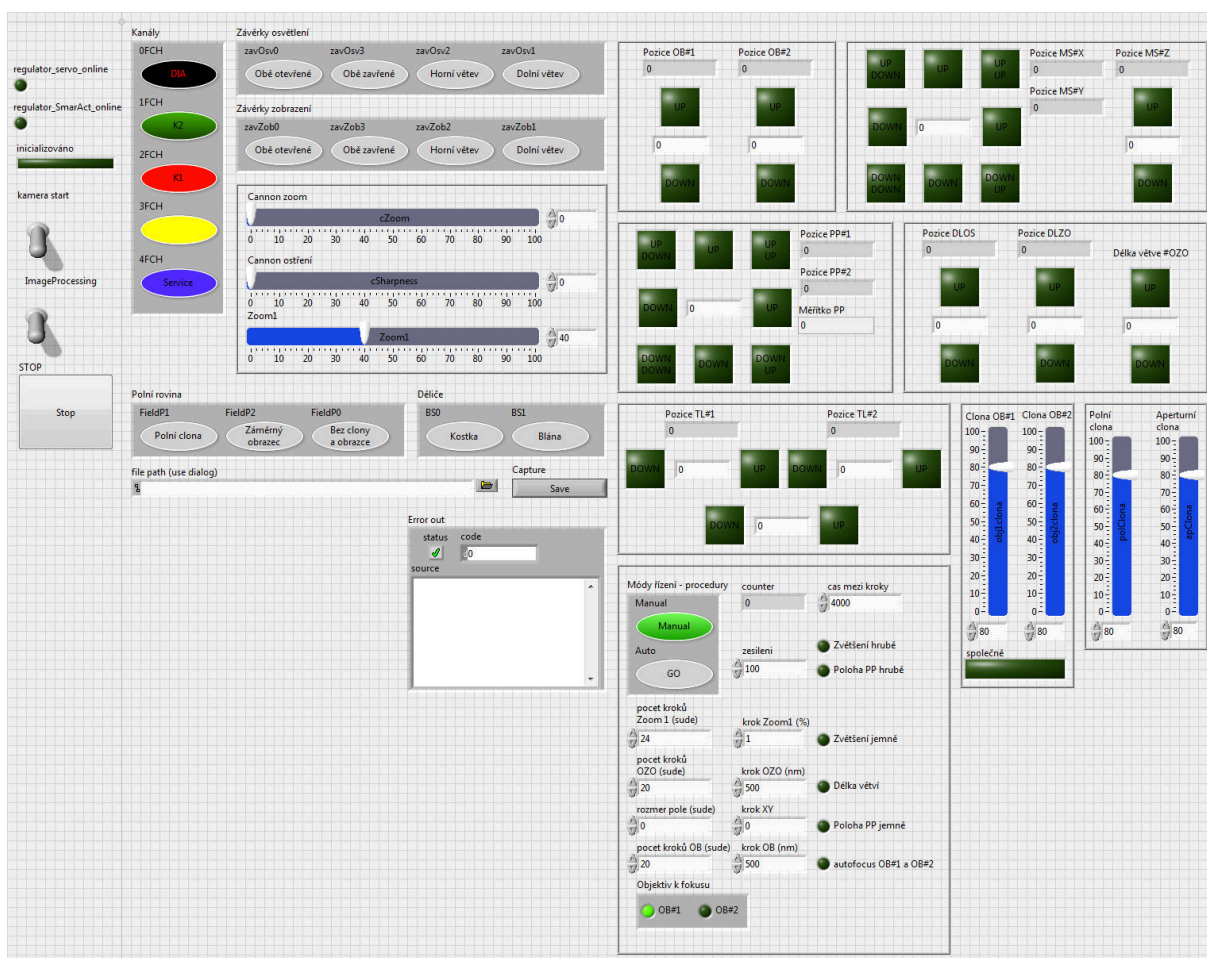
Obrázek 26: Zjednodušené blokové schéma řídicího softwaru FHM mikroskopu.

pových objektivů $O_{1,2}$ s mikroskopovým stolcem MS v ose z OZO a posuv mikroskopového stolku MS v osách x a y . K vlastnímu zasílání příkazů regulátorům se využívají podprogramy, které pozastaví smyčku programu uživatelského prostředí, zašlou příkaz do datové mezivrstvy a čekají do té doby, dokud regulátor nezašle do datové mezivrstvy žádanou odpověď. Tím je zaručeno, že každý příkaz uživatele či automatické procedury je vykonán a nemůže být přeskočen. Se všemi regulátory a programy komunikuje program uživatelského rozhraní také přímo zápisem a čtením z datové mezivrstvy. Pro ukončení běhu softwaru využívá poslední stav programu. Při něm se všem programům a regulátorům zašle příkaz, aby se ukončily, a tím se deaktivuje komunikace s hardwarem.

8.2 Regulátor servopohonů

První z regulátorů obsluhuje servopohony. Tento regulátor po svém spuštění sám inicializuje řídicí kartu SSC-32 a očekává příkaz z datové mezivrstvy. Rozhraní regulátoru je znázorněno na obrázku 28. Pro každý říditelný kanál obsahuje regulátor možnosti nastavení. Jedná se o koncové polohy mechanismů - tedy servopohonů, nastavení rychlosti pohybu, polohy servopohonů pro jednotlivé stavy, možnost nastavení offsetu pohybu nebo možnost kanál úplně vypnout.

Mechanismy lze rozdělit do dvou kategorií. Prvé jsou mechanismy s přesně definovanými polohami - stavy (například stavy závěrek Záv, základací mechanismus polní clony PC a seřizovací clony SC, mechanismy změny fluorescenčního kanálu - výměna flu-



Obrázek 27: Panel programu uživatelského rozhraní softwaru FHM mikroskopu.

orescenčních sestav filtrů FSF, difrakčních mřížek DM a pod.). Druhou kategorií jsou mechanismy s proporcionální změnou (průměry clon, změny ohnisek zoom objektivů Zoom, změna ohniska a ostření výstupního objektivu VO₃). Z datové mezivrstvy proto regulátor vyčítá dva druhy příkazů, které mají vždy formu textového řetězce. Buď jde o kód stavu prvního typu mechanismů, nebo kombinaci informace o řízené funkci a o číselné hodnotě pohybu obvykle v procentech, kdy 0 % a 100 % značí polohy odpovídající rozsahu pohybu. Regulátor řetězce dekoduje a převádí jejich informace na pokyny pro jednotlivé servopohony. Poté, co řídicí karta obdrží informace a vykoná požadované pohyby, vrací regulátoru informaci o splnění požadavků, a ta je formou odpovědního návratového řetězce zaslána datové mezivrstvě. Kromě toho je pro ladění jednotlivých pohybů naprogramována možnost řídit servopohony ručně. Tím lze získat všechny hodnoty nastavení jednotlivých kanálů.



Obrázek 28: Panel regulátoru servopohonů s možnostmi plného nastavení každého říditelného kanálu řídicí karty.

8.3 Regulátor lineárních stolků

Druhý z regulátorů obsluhuje lineární stolky SmarAct. Tento regulátor po svém spuštění sám inicializuje jejich řídicí elektroniku, postupně u všech lineárních stolků nalezne reference, a tím zjistí jejich fyzické pozice. Poté očekává příkaz z datové mezivrstvy. Rozhraní regulátoru je znázorněno na obrázku 29. Pro každý říditelný kanál obsahuje regulátor možnosti nastavení. Jedná se o koncové polohy stolků, nastavení rychlosti a akceleraci pohybu, polohy stolků, možnost nastavení offsetu nebo reverzovat smysl pohybu stolku.

Z datové mezivrstvy regulátor vyčítá příkazy ve formě textového řetězce. Kód obsahuje informaci o řízené funkci a požadovanou číselnou hodnotu polohy lineárního stolku v nanometrech. Regulátor řetězec dekóduje a převede číselnou informaci na pokyny pro jednotlivé lineární stolky. Poté, co řídicí elektronika obdrží informace a vykoná požadované pohyby, je testováno, zda odchylka držené polohy stolku je nižší než povolená tolerance. Pokud ano, vrací regulátor návratovou informaci programové mezivrstvě. Kromě toho je pro ladění jednotlivých pohybů naprogramována možnost řídit lineární stolky ručně a je možno po inicializaci spouštět kalibrace. Tímto lze opět získat všechny hodnoty nastavení jednotlivých kanálů.

8.4 Program kamery Basler

Tento program vyčítá obrazová data z kamery Basler. Skládá se ze dvou částí. Prvou je program, který generuje firmware pro programovatelné hradlové pole (FPGA - Field Programmable Gate Array) graberu kamery. Druhou je spustitelný kód, který s firmwarem komunikuje a který z něj pomocí nástrojů programování hradlového pole pro LabView vyčítá pořízené snímky. Tento program je odvozen od vzorového programu k ovládání kamery. Grabber s hradlovým polem byl vybrán záměrně, protože dovoluje nahradit poslední část softwaru a tak zpracovávat obraz přímo bez zatížení procesoru počítače. Zatím je tato možnost z časové náročnosti programování nevyužita a pro testování funkcí mikroskopu je zatím nevýznamná.

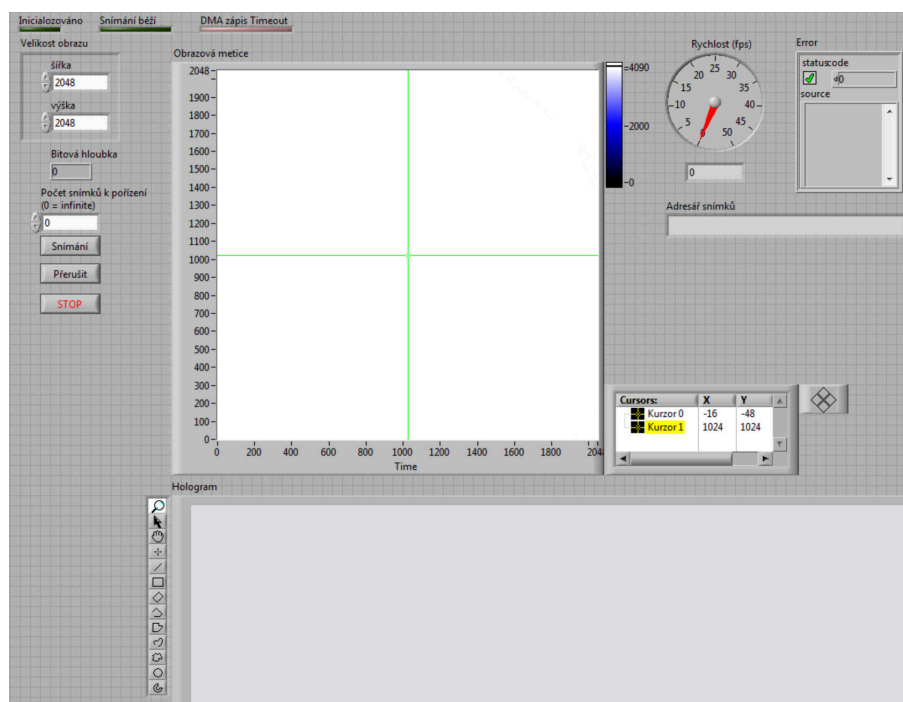
Po spuštění programu dojde k inicializaci kamery a spustí se i server grabberu, který využívá program Pylon 4 pro nastavení kamery. Na obrázku 30 je zobrazen panel programu. Uživatel před zahájením snímání musí v Pylonu 4 nastavit bitovou hloubku CMOS čipu, typ transportní vrstvy pro přenos dat po rozhraní CameraLink. Poté lze z programu uživatelského rozhraní zahájit snímkování. V průběhu práce s mikroskopem uživatel využívá program Pylon 4 pro nastavení expozice a zisku kamery. Na frontálním panelu programu kamery se zobrazují vyčtená data a rychlost, se kterou jsou snímky vyčítány z kamery. Z programu uživatelského rozhraní lze spouštět ukládání snímků a nastavovat adresu složky, do které se mají snímky uložit. Tyto informace jsou opět posílány přes datovou mezivrstvu. Do ní program vpisuje 2D matice obrazových dat pro zpracování automatickými procesy, nebo zdrojová data programu zpracování obrazu. Obdobně jako u regulátorů lze program využívat samostatně bez zásahů uživatelského rozhraní.



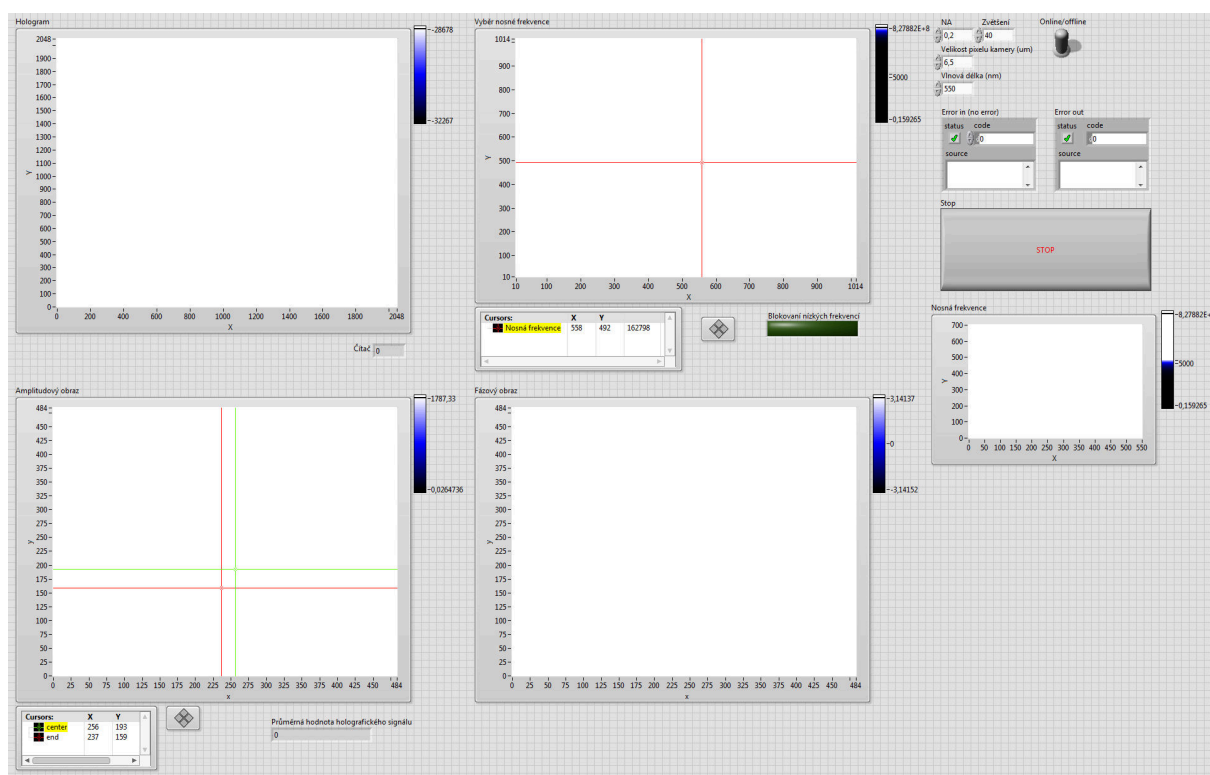
Obrázek 29: Panel regulátoru lineárních stolků SmarAct s možnostmi plného nastavení každého říditelného kanálu řídicí elektroniky.

8.5 Program ke zpracování obrazu

Poslední program jako jediný nekomunikuje s hardwarem, nýbrž jen s datovou mezivrstvou. Vyčítá z ní informace ve formě 2D pole obrazových hodnot, která podle schématu na obrázku 3 zpracovává a získává tak amplitudový a fázový obraz. Program lze také spustit s hologramy pořízenými dříve. Na obrázku 31 je zobrazen panel programu. Je možno nastavit parametry rekonstrukce, jako je numerická apertura mikroskopových objektivů, zvětšení mikroskopu, velikost pixelů kamery a střední vlnová délka interferujícího záření. Z těchto parametrů je počítána velikost výřezu dat prostorových frekvencí okolo nosné frekvence interferenčních proužků, na který je použito Hanningovo okno. Polohu nosné frekvence ve spektru lze zvýraznit začleněním nízkých frekvencí a pomocí kurzoru tuto polohu nastavit. Důležitou hodnotou, kterou program počítá a zapisuje do datové mezivrstvy, je průměrná hodnota měřeného holografického signálu \bar{w}_D .



Obrázek 30: Výřez z panelu programu pro vyčítání obrazů kamery Basler.



Obrázek 31: Panel programu pro zpracování pořízených hologramů. Všechny parametry zpracování je možno nastavit z panelu.

9 Závěr

Tato práce velkou měrou přispěla k uživatelské přívětivosti holografických mikroskopů a umožnila jejich využití na biologických pracovištích tím, že zavedla automatickou justáž a řízení komplikované optické soustavy těchto mikroskopů. Byly aplikovány justážní metody, založené na kombinaci jednoduchých a účelných justážních procedur vycházejících z praktických zkušeností s holografickými mikroskopy. Pro tyto metody byla nalezena spolehlivá veličina vhodně kvantifikující stav mikroskopu v podobě průměrné hodnoty měřeného holografického signálu \overline{w}_D , který je online zjišťován při numerickém zpracování hologramů během pozorování. Jednotlivé procedury byly úspěšně otestovány a poté byly převzaty do komerčních verzí Q-PHASE koherencí řízeného holografického mikroskopu. Pro chod těchto procedur byly navrženy robotické mechanismy řízené z obslužného PC. Kromě toho byl vytvořen také řídicí software pro Fluorescenční holografický mikroskop, v němž byly tyto procedury integrovány. Výsledky této disertační práce jsou shrnuty v článku [66] a chráněny patentem [62].

V rámci dalšího vývoje justážních procedur bude probíhat jejich úprava pro budoucí biologické aplikace FHM. S tím bude souviset i budoucí vývoj obslužného softwaru. Také budou testovány sestavy CCHM mikroskopu se zjednodušenou zobrazovací větví. To umožní vytvořit jednoúčelový robotizovaný mikroskop.

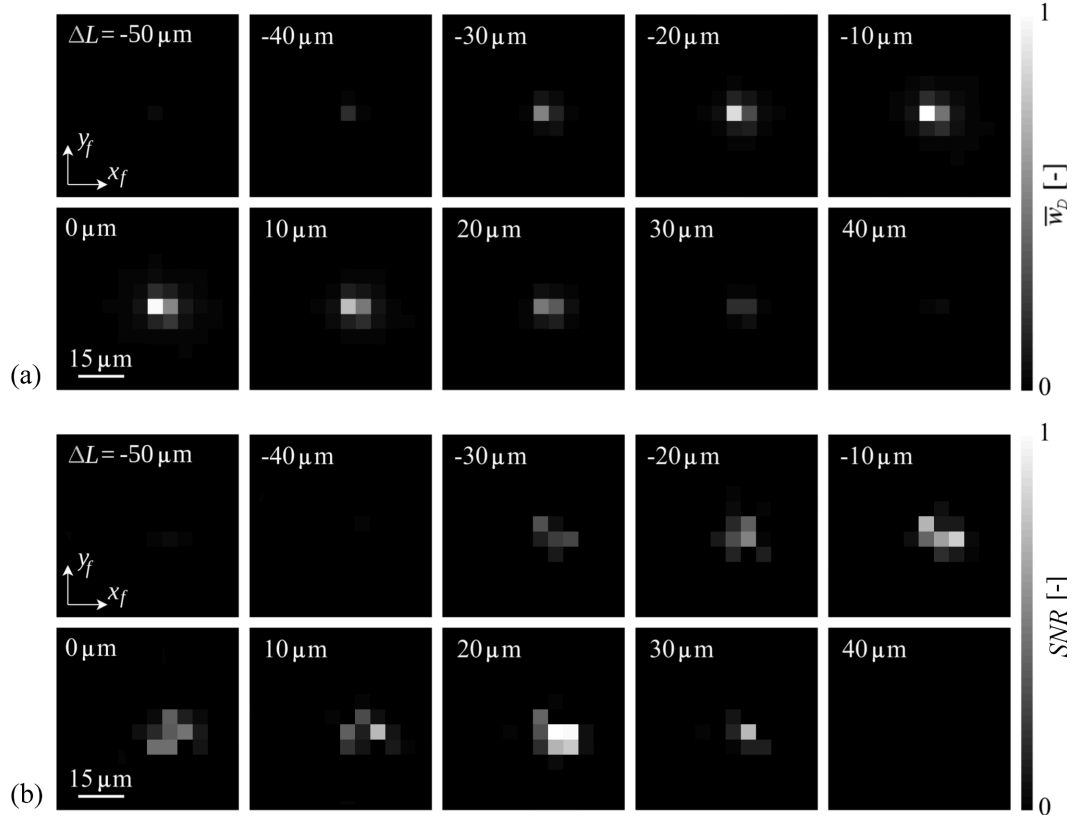
A Alternativní veličina pro justáž mikroskopů

Pro hodnocení stavu justáže holografických mikroskopů byla - kromě teoretického holografického signálu \bar{w} - testována také alternativní veličina vypočtená z komplexní amplitudy. Protože je možno považovat za hodnotící kritérium i to, aby byly hodnoty obrazové amplitudy vysoké s minimálním šumem, nabízí se možnost využít k justáži mikroskopu poměr signál/šum SNR , který lze definovat vztahem

$$SNR = \frac{\bar{w}_D}{\sigma_{w_D}}, \quad (13)$$

kde σ_{w_D} je směrodatná odchylka vypočtená z matice hodnot komplexní amplitudy $w_D(i, j)$.

K prokázání, že také poměr signál/šum má své globální maximum pro $|\mathbf{q}_f - \mathbf{q}_t(M - 1)| = 0 \mu\text{m}$ a $\Delta L = 0 \mu\text{m}$ pro $M = 1$ s úzkopásmovým světelným zdrojem, byly při měření holografického signálu \bar{w}_D vyčítány i hodnoty SNR . Tato data jsou na obrázku 32 porovnávána s průběhem měřeného holografického signálu. Porovnáme-li ovšem průběh hodnot průměrné amplitudy \bar{w}_D (obrázek 32(a)) s průběhem podílu signálu a šumu SNR (obrázek 32(b)) je zcela zřejmé, že průměrná amplituda \bar{w}_D má podstatně lépe definované ostré maximum. Na základě tohoto srovnání jsme zvolili jako kritérium kvality justáže mikroskopu holografický signál.



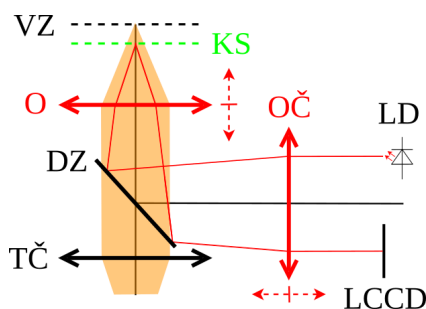
Obrázek 32: Porovnání závislosti měřeného holografického signálu \bar{w}_D a poměru signál/šum SNR na posunutí \mathbf{q}_f pro $\Delta L = 0 \mu\text{m}$ a $M = 1$ s úzkopásmovým světelným zdrojem. Měření \bar{w}_D a SNR je prezentováno stejným způsobem jako na obrázku 5.

B Metoda hodnocení ostrosti obrazu CCHM mikroskopu

V současných vědeckých mikroskopech je nedílnou součástí přístroje systém na udržování fokuse mikroskopového objektivu. Tento dodatek je zaměřen právě na tuto problematiku. Autofokusační metody lze rozdělit dle jejich principu na metody opírající se o vhodnou softwarovou analýzu pozorovaného obrazu a o hardwarové vybavení přístroje. Hardwarové metody by znamenaly pro oba mikroskopy, popisované v této práci, doplnění dalších optických prvků. Proto bylo zvoleno softwarové řešení. Prvá metoda, založená na posuzování ostrosti obrazu v závislosti na změně velikosti měřeného holografického signálu \bar{w}_D byla již popsána v části 6.2.2 a také aplikována na novější mikroskop (FHM). Pro mikroskop CCHM byla použita dříve navržená metoda softwarového autofokusu.

B.1 Hardwarový autofokus pro mikroskopii

Hardwarový autofokus je často dodáván jako komerčně prodáváný přídatný modul k běžným mikroskopům. Je založen na principu odrazu světla pomocného zdroje od vzorku a jeho následné detekci. Princip autofokusu Nikon Perfect Focus System [81] je na obrázku 33. Z diodového zdroje LD vychází světlo, které prochází ofsetovou čočkou OČ a objektivem O na krycí sklo KS. Od něj je světlo odraženo a dopadá na řádkový detektor LCCD. Pomocí pohybu ofsetové čočky OČ lze nastavit rovinu ostrosti, tedy její vzdálenost od krycího skla KS. Je-li vzorek VZ z důvodu tepelného driftu či vibrací vychýlen z požadované roviny ostrosti, odrazí se světlo diody mimo střed LCCD. V závislosti na výchylce je pomocí pohybu mikroskopového stolku či výsuvem objektivu O vzorek VZ doostřen. Na podobných principech jsou založeny i metody firem Prior Scientific Instruments [82] nebo Motion X Corporation [83].



Obrázek 33: Optické schéma Nikon Perfect Focus System: VZ - vzorek, KS - krycí sklo, O - mikroskopový objektiv, DZ - dichroické zrcadlo, TČ - tubusová čočka, OČ - ofsetová čočka, LD - laserová dioda, LCCD - lineární CCD čip. Převzato a překresleno z [81].

Nespornou výhodou je rychlost, se kterou je doostřeno, dojde-li k vychýlení vzorku. Bohužel, velká nevýhoda je přesně definovaná rovina ostrosti, kterou je třeba nastavit před začátkem experimentu. Není tedy hlídáno, zda je pozorovaný objekt v preparátu (například živá buňka) stále ostrý. To může vést ke snížení kvality obrazu, například při

pozorování mitózy buněk, kdy dochází ke vzdálení dělicí se buňky od krycího skla, nebo při 3D trasování volně se pohybujících buněk v prostoru [84].

B.2 Softwarový autofokus

Možností, jak udržet i dynamický děj stále zaostřený, je použití takové metody, která průběžně vyhodnocuje ostrost obrazu a podle zjištěné hodnoty pozorovaný objekt doostří. Pro určování ostrosti obrazu mikroskopických vzorků je možno použít většího počtu matematických metod, které lze rozdělit do čtyř kategorií [85]. Jsou to metody intuitivní a metody založené na derivaci, statistice a analýze histogramu obrazových dat. Pro testování ostrosti obrazového výstupu CCHM (amplitudový obraz a kvantitativní fázový obraz) byly zvoleny tyto metody:

- variance rozložení hodnot šedi (*VAR*), která je definována vztahem

$$VAR = \frac{1}{N_x N_y} \sum_{xy} [g(x, y) - \bar{g}]^2, \quad (14)$$

kde N_x a N_y jsou rozměry obrazové matice G s hodnotami pixelů $g(x, y)$ a \bar{g} je střední hodnota pixelů obrazové matice,

- kumulativní detekce hran podle gradientního počtu (*GRA*), která je definována vztahem

$$GRA = \sum_{x=1}^{N_x} \sum_{y=1}^{N_y} \sqrt{[g(x, y) - g(x - 1, y)]^2 + [g(x, y) - g(x, y - 1)]^2}, \quad (15)$$

- kumulativní detekce hran Laplacovou filtrací (*LAP*), která je definována vztahem

$$LAP = \sum_{x=1}^{N_x} \sum_{y=1}^{N_y} [g(x + 1, y) + g(x - 1, y) + g(x, y + 1) + g(x, y - 1) - 4g(x, y)]^2. \quad (16)$$

Důvody, proč byly tyto metody vybrány, jsou rychlá konvergence a prokázaná schopnost najít rovinu ostrosti pro buněčné preparáty [86, 87]. V obou publikacích jsou metody využívány pro hodnocení ostrosti v digitálních holografických off-axis mikroskopech, které využívají koherentní zdroj světla.

V publikaci [86] jsou metody aplikovány při vyhodnocování experimentu na dříve pořízených datech pomocí iteračního postupu, který spočívá v numerickém přeostrění a následném hodnocení ostrosti obrazu. Postupně jsou zpracována veškerá data a výstupem jsou ostré snímky. Naproti tomu v článku [87] jsou metody aplikovány při pořizování obrazu. Rovina ostrosti je hledána pomocí pohybu kamery podél optické osy do doby, dokud není obraz vyhodnocen jako ostrý. Díky znalosti podélného zvětšení zobrazovací soustavy je výchylka kamery od její výchozí polohy převedena na výchylku mikroskopového objektivu. V publikaci jsou pro každou metodu uvedeny výpočetní časy. Pro metodu *VAR*

vychází nejnížší. Tato vlastnost je důležitá, protože snižuje čas, který je potřeba k zaostření preparátu.

Prvá metoda dle [86] se zdá pro naše účely nepoužitelná, protože je CCHM používáno s polychromatickým světelným zdrojem, který má nízkou koherenci. Možnost numericky přeastřovat je velmi nízká [65]. Jedinou možností je změnit koherenci světla zdroje tak, aby se dalo numericky přeastřovat, najít rovinu ostrosti, podle zjištěné vzdálenosti fyzicky přeastřit a obnovit koherenci světla na původní hodnotu. Druhou metodu dle [87] lze použít jen s tím, že rovina ostrosti bude hledána přímo změnou polohy mikroskopového objektivu a preparátu, protože kamera mikroskopu je umístěna pevně.

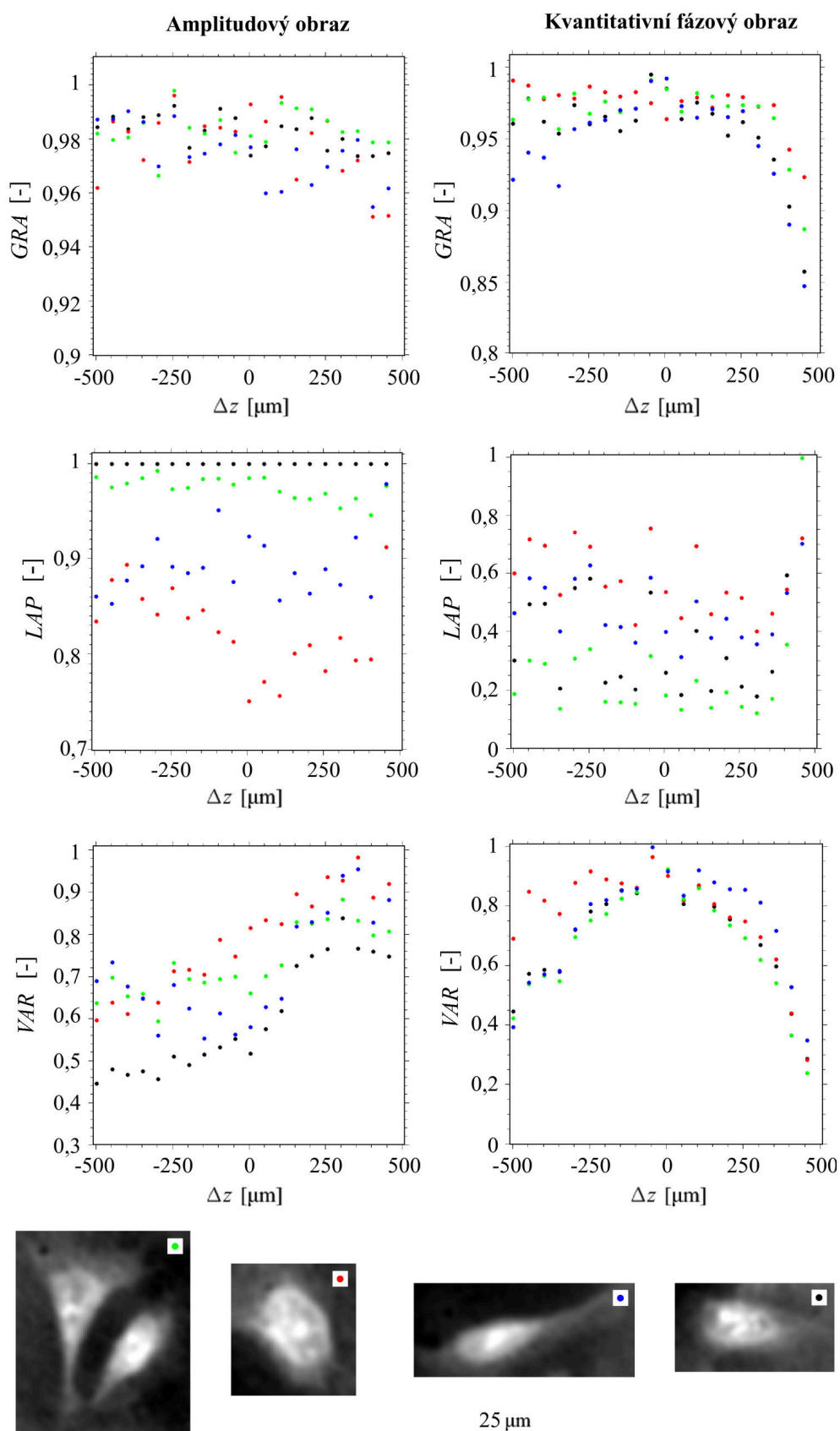
B.3 Experiment

Cílem prvotního experimentu je porovnat výsledky výše popsaných metod hodnocení ostrosti pro biologický preparát a stanovit tak vhodnou metodu, použitelnou pro CCHM. Metody byly experimentálně vyzkoušeny na sérii snímků, které byly pořízeny v rozsahu posunutí $\Delta z = \pm 200 \mu\text{m}$. Zaostřený snímek byl uprostřed série. Byly snímány krysí rakovinné buňky fibrosarkomu (K2) pomocí objektivů Nikon 10/0,3. Polychromatické světlo bylo upraveno interferenčním filtrem FB650-10 ($\lambda = 650 \text{ nm}$, $\text{FWHM} = 10 \text{ nm}$) od firmy Thorlabs. Stejně, jako bylo zjištěno v [87], dochází i u CCHM k tomu, že kontrast amplitudového obrazu je minimální, právě když je kvantitativní fázový obraz ostrý a naopak. Je-li fázový snímek neostrý, pak v amplitudovém jsou buňky rozpoznatelné. Z toho důvodu je zapotřebí hledat na amplitudových snímcích minimum a na fázových maximum funkcí (14), (15) a (16). Na obrázku 34 jsou uvedeny získané hodnoty pro vybrané buňky. Je zřejmé, že metody *GRA* a *LAP* na amplitudovém i kvantitativním fázovém obrazu selhávají. Na jejich průbězích nelze bezpečně rozpoznat jednoznačné minimum či maximum. Metoda *VAR* dokázala nejlépe určit ostrý snímek u kvantitativního fázového obrazu. Maximum je jasně zřetelné v okolí středu série snímků. Na amplitudovém obraze metoda *VAR* také selhala.

B.4 Návrh metody softwarového autofokusu

Metodu softwarového autofokusu převzala společnost TESCANA ORSAY HOLDING a aplikovala ji v kombinaci s hledáním roviny ostrosti pomocí numerického přeastření (obdobně jako v [86]) do programu Q-PHASE, který řídí komerční verze CCHM mikroskopů.

Metoda spočívá v uživatelském výběru buněk, které mají být pozorovány. Pravidelně mezi snímky experimentu a mezi úkony procedury pro dlouhodobé pozorování probíhají kroky autofokusu. Je měněna prostorová koherence světla sevřením aperturní clony AC, zaznamenán hologram a ten je numericky přeastřen. Hodnota ostrosti je klasifikována na kvantitativním fázovém obrazu veličinou *VAR* (14). Podle zjištěné hodnoty posunutí je upravena pozice vzorku SC a mikroskopového objektivu O_1 .



Obrázek 34: Průběhy hodnot GFA , LAP a VAR pro vybrané buňky. Hodnoty vynesené na osu y jsou normovány vůči jejich maximu. U obrázků buněk byl zvýšen kontrast.

Literatura

- [1] Davides, H. G.; Wilkins, M. H. F.; Chayen, J.; a kol. *The Use of the Interference Microscope to Determine Dry Mass in Living Cells and as a Quantitative Cytochemical Method*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, ročník s3-95, č. 31 1954: s. 271–304.
- [2] Heimstädt, O. *Das fluoreszenzmikroskop*. *Z Wiss Mikrosk*, ročník 28 1911: s. 330–337.
- [3] Hirt, A.; Ellinger, P. *Method and device for microscopically viewing living objects*. Prosinec 1932, US Patent 1,891,348.
- [4] Albani, J. *Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies: Absorption and Fluorescence Studies*. Elsevier Science, 2011 ISBN 9780080474489.
- [5] Zhang, G.; Gurtu, V.; Kain, S. R. *An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, ročník 227, č. 3 1996: s. 707 – 711 ISSN 0006-291X doi:10.1006/bbrc.1996.1573.
- [6] Ploem, J. *The use of a vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incident light*. *Z Wiss Mikrosk*, ročník 68, č. 3 1967: s. 129–142.
- [7] Ploem, J. S. *Fluorescence microscopy*. 1999 s. 3–13.
- [8] Ritzen, M. *Quantitative fluorescence microspectrophotometry of catecholamine-formaldehyde products: Model experiments*. *Experimental Cell Research*, ročník 44, č. 2-3 1966: s. 505–520 ISSN 0014-4827 doi:10.1016/0014-4827(66)90456-3.
- [9] Song, L.; Hennink, E.; Young, I. T.; a kol. *Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy*. *Biophysical journal*, ročník 68, č. 6 1995: str. 2588 doi:10.1016/S0006-3495(95)80442-X.
- [10] Minsky, M. *Microscopy apparatus*. Prosinec 1961, US Patent 3,013,467 URL <http://www.google.com/patents/US3013467>.
- [11] Minsky, M. *Memoir on inventing the confocal scanning microscope*. *Scanning*, ročník 10, č. 4 1988: s. 128–138 doi:10.1002/sca.4950100403.
- [12] M. Shotton, D. *Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens*. *Journal of Cell Science*, ročník 94, č. 2 1989: s. 175–206 URL <http://jcs.biologists.org/content/94/2/175.abstract>.
- [13] Milan, H.; Mojmir, P. *Method and arrangement for improving the resolving power and contrast*. Červen 1970, US Patent 3,517,980 URL <https://www.google.com/patents/US3517980>.

- [14] Hell, S.; Pick, R. *Confocal microscope comprising two microlens arrays and a pinhole diaphragm array*. Srpen 2005, US Patent 6,934,079.
- [15] Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W. *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. *Science*, ročník 248, č. 4951 1990: s. 73–76 doi:10.1126/science.2321027.
- [16] Axelrod, D.; Koppel, D.; Schlessinger, J.; a kol. *Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics*. *Biophysical Journal*, ročník 16, č. 9 1976: s. 1055 – 1069 ISSN 0006-3495 doi:10.1016/S0006-3495(76)85755-4.
- [17] Wüstner, D.; Solanko, L. M.; Lund, F. W.; a kol. *Quantitative fluorescence loss in photobleaching for analysis of protein transport and aggregation*. *BMC bioinformatics*, ročník 13, č. 1 2012: str. 296 doi:10.1186/1471-2105-13-296.
- [18] Helms, V. *Principles of Computational Cell Biology*. kapitola Fluorescence Resonance Energy Transfer, Wiley-Blackwell 2008 ISBN 9783527315550 str. 202 URL <https://books.google.cz/books?id=-Tavvybv5UwC>.
- [19] Abbe, E. *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, ročník 9, č. 1 1873: s. 413–418 ISSN 0176-7364 doi:10.1007/BF02956173.
- [20] Hell, S. W.; Wichmann, J. *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*. *Opt. Lett.*, ročník 19, č. 11 Červen 1994: s. 780–782 doi:10.1364/OL.19.000780.
- [21] Vicidomini, G.; Moneron, G. *Gated STED Microscopy with CW-STED Lasers*. Duben 2012 [online] <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/gated-sted-microscopy-with-cw-sted-lasers/>.
- [22] Silfies, J. S.; Schwartz, S. A.; Davidson, M. W. *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)*. [online] <https://www.microscopyu.com/articles/superresolution/stormintro.html>.
- [23] Kner, P.; Chhun, B. B.; Griffis, E. R.; a kol. *Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination*. *Nature Methods*, ročník 6, č. 5 2009: s. 339 – 342 ISSN 15487091 doi:10.1038/nmeth.1324.
- [24] Rumbaut, R. E.; Sial, A. J. *Differential Phototoxicity of Fluorescent Dye-Labeled Albumin Conjugates*. *Microcirculation*, ročník 6, č. 3 1999: s. 205–213 ISSN 1549-8719 doi:10.1111/j.1549-8719.1999.tb00103.x.
- [25] Zernike, F. *Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects*. *Physica*, ročník 9, č. 7 1942: s. 686–698 ISSN 00318914 doi:10.1016/S0031-8914(42)80035-X.

- [26] Zernike, F. *Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects, part II. Physica*, ročník 9, č. 10 1942: s. 974–986 ISSN 00318914 doi:10.1016/S0031-8914(42)80079-8.
- [27] Nomarski, G. *Interferential polarizing device for study of phase objects*. Únor 1960, US Patent 2,924,142 URL <https://www.google.cz/patents/US2924142>.
- [28] Hoffman, R.; Gross, L. *The modulation contrast microscope. Nature*, ročník 254, č. 5501 1975-4-17: s. 586–588 ISSN 00280836 doi:10.1038/254586a0.
- [29] Mir, M.; Bhaduri, B.; Wang, R.; a kol. *Progress in Optics*. kapitola Quantitative Phase Imaging, Elsevier 2012 s. 133–217.
- [30] Gabor, D. *A New Microscopic Principle. Nature*, ročník 161 Květen 1948: s. 777–778 doi:10.1038/161777a0.
- [31] Gorocs, Z.; Ozcan, A. *On-Chip Biomedical Imaging. Biomedical Engineering, IEEE Reviews in*, ročník 6 2013: s. 29–46 ISSN 1937-3333 doi:10.1109/RBME.2012.2215847.
- [32] Török, P. *Optical imaging and microscopy: techniques and advanced systems*. ročník 87 kapitola Low-Coherence Interference Microscopy Springer Science & Business Media 2003 s. 256–257.
- [33] Cherry, R. J. *New Techniques of Optical Microscopy and Microspectroscopy*. Topics in Molecular and Structural Biology CRC-Press, 1991 ISBN 9780849371172 URL <https://books.google.cz/books?id=r-c0mnw-hC8C>.
- [34] Leitz GmbH & Co KG *Transmitted-Light Interference Microscope*.
- [35] Wang, Z.; Millet, L.; Mir, M.; a kol. *Spatial light interference microscopy (SLIM). Opt. Express*, ročník 19, č. 2 Leden 2011: s. 1016–1026 doi:10.1364/OE.19.001016.
- [36] Leiht, E. N.; Upatnieks, J. *Reconstructed Wavefronts and Communication Theory. J. Opt. Soc. Am.*, ročník 52, č. 10 Říjen 1962: s. 1123–1128 doi:10.1364/JOSA.52.001123.
- [37] Vanligten, R. F.; Osterberg, H. *Holographic microscopy. Nature Publishing Group*, 1966 doi:10.1038/211282a0.
- [38] Marquet, P.; Rappaz, B.; Magistretti, P. J.; a kol. *Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. Opt. Lett.*, ročník 30, č. 5 Březen 2005: s. 468–470 doi:10.1364/OL.30.000468.
- [39] Shaked, N. T.; Satterwhite, L. L.; Rinehart, M. T.; a kol. *Holography, Research and Technologies*. kapitola Quantitative Analysis of Biological Cells Using Digital Holographic Microscopy, InTech 2011 s. 219–236 doi:10.5772/15122.
- [40] Bhaduri, B.; Pham, H.; Mir, M.; a kol. *Diffraction phase microscopy with white light. Opt. Lett.*, ročník 37, č. 6 Březen 2012: s. 1094–1096 doi:10.1364/OL.37.001094.

- [41] Janečková, H.; Kolman, P.; Veselý, P.; a kol. *Digital holographic microscope with low spatial and temporal coherence of illumination*. in *Photonics Europe* International Society for Optics and Photonics 2008 s. 70002E–70002E.
- [42] Kolman, P.; Chmelík, R. *Coherence-controlled holographic microscope*. *Opt. Express*, ročník 18, č. 21 Říjen 2010: s. 21990–22003 doi:10.1364/OE.18.021990.
- [43] Slaby, T.; Kolman, P.; Dostal, Z.; a kol. *Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope*. *Opt. Express*, ročník 21, č. 12 Červen 2013: s. 14747–14762 doi:10.1364/OE.21.014747 [doi:10.1364/OE.21.014747].
- [44] Chmelík, R.; Harna, Z. *Parallel-mode confocal microscope*. *Optical Engineering*, ročník 38, č. 10 1999: s. 1635–1639 doi:10.1117/1.602217.
- [45] Lostak, M.; Kolman, P.; Dostal, Z.; a kol. *Diffuse light imaging with a coherence controlled holographic microscope*. *Proc. SPIE*, ročník 7746 2010: s. 77461N–77461N–9 doi:10.1117/12.882198.
- [46] Lostak, M.; Chmelík, R.; Slaba, M.; a kol. *Coherence-controlled holographic microscopy in diffuse media*. *Opt. Express*, ročník 22, č. 4 Únor 2014: s. 4180–4195 doi: 10.1364/OE.22.004180.
- [47] Collakova, J.; Krizova, A.; Kollarova, V.; a kol. *Coherence-controlled holographic microscopy enabled recognition of necrosis as the mechanism of cancer cells death after exposure to cytopathic turbid emulsion*. *Journal of Biomedical Optics*, ročník 20, č. 11 2015: str. 111213 doi:10.1117/1.JBO.20.11.111213.
- [48] Lovicar, L.; Komrska, J.; Chmelík, R. *Quantitative-phase-contrast imaging of a two-level surface described as a 2D linear filtering process*. *Opt. Express*, ročník 18, č. 20 Září 2010: s. 20585–20594 doi:10.1364/OE.18.020585.
- [49] Gustafsson, M. G. L.; Sedat, J. W.; Agard, D. A. *Method and apparatus for three-dimensional microscopy with enhanced depth resolution*. Září 1997, US Patent 5,671,085 URL <http://www.google.com/patents/US5671085>.
- [50] Hess, H. *Systems and methods for 3-dimensional interferometric microscopy*. Červenec 2008, US Patent App. 11/961,601.
- [51] Kolman, P.; Chmelík, R. *Interferometrický systém a způsob měření prostorového rozložení indexu lomu*. Červen 2016, CZ patent 306015.
- [52] Salmon, E. D.; Canman, J. C. *Proper Alignment and Adjustment of the Light Microscope*. John Wiley & Sons, Inc. 2001 ISBN 9780471142904 doi:10.1002/0471142905.hga03ns38.
- [53] Olympus America Inc., www.olympusmicro.com/micd/anatomy/micdbrightfield.html, [Online; 12. Května 2016].

- [54] Steyer, J.; Almers, W. *Tracking Single Secretory Granules in Live Chromaffin Cells by Evanescent-Field Fluorescence Microscopy*. *Biophysical Journal*, ročník 76, č. 4 1999: s. 2262 – 2271 ISSN 0006-3495 doi:10.1016/S0006-3495(99)77382-0.
- [55] Köhler, A. *Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke*. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und mikroskopische Technik*, ročník 10 1893: s. 433–440 URL <http://www.archive.org/stream/zeitschriftfrw10stut#page/432/mode/2up/search/kohler>.
- [56] Gould, T. J.; Kromann, E. B.; Burke, D.; a kol. *Auto-aligning stimulated emission depletion microscope using adaptive optics*. *Opt. Lett.*, ročník 38, č. 11 Červen 2013: s. 1860–1862 doi:10.1364/OL.38.001860.
- [57] Kalamatianos, D.; Wellstead, P. E.; Edmunds, J. M.; a kol. *Active alignment for two-beam interferometers*. *Review of Scientific Instruments*, ročník 77, č. 1 2006: 013103 doi:10.1063/1.2150823.
- [58] Schwiesow, R. *Stabilization mechanism for optical interferometer*. Duben 1984, US Patent 4,444,501 URL <http://www.google.tl/patents/US4444501>.
- [59] Morrison, E.; Meers, B. J.; Robertson, D. I.; a kol. *Automatic alignment of optical interferometers*. *Appl. Opt.*, ročník 33, č. 22 Srpen 1994: s. 5041–5049 doi:10.1364/AO.33.005041.
- [60] Iwai, H.; Fang-Yen, C.; Popescu, G.; a kol. *Quantitative phase imaging using actively stabilized phase-shifting low-coherence interferometry*. *Opt. Lett.*, ročník 29, č. 20 Říjen 2004: s. 2399–2401 doi:10.1364/OL.29.002399.
- [61] Krishnamachari, V. V.; Andresen, E. R.; Keiding, S. R.; a kol. *An active interferometer-stabilization scheme with linear phase control*. *Opt. Express*, ročník 14, č. 12 Červen 2006: s. 5210–5215 doi:10.1364/OE.14.005210.
- [62] Chmelik, R.; Dostal, Z.; Kolman, P.; a kol. *Interferometric system with variable optics for non-coherent radiation source and method of tuning such interferometric system*. 2014, PV 2014-538.
- [63] Leith, E. N.; Upatnikes, J. *Holography with Achromatic-Fringe Systems*. *J. Opt. Soc. Am.*, ročník 57, č. 8 Srpen 1967: s. 975–979 doi:10.1364/JOSA.57.000975.
- [64] Chmelik, R.; Slaba, M.; Kollarova, V.; a kol. *Progress in Optics*. kapitola The role of coherence in image formation in holographic microscopy, Elsevier 2014 s. 133–217.
- [65] Týč, M.; Kvasnica, L.; Slabá, M.; a kol. *Numerical refocusing in digital holographic microscopy with extended-sources illumination*. *Opt. Express*, ročník 21, č. 23 Listopad 2013: s. 28258–28271 doi:10.1364/OE.21.028258.

- [66] Dostal, Z.; Slaby, T.; Kvasnica, L.; a kol. *Automated alignment method for coherence-controlled holographic microscope. Journal of Biomedical Optics*, ročník 20, č. 11 2015: str. 111215 doi:10.1117/1.JBO.20.11.111215.
- [67] Harris, F. *On the use of windows for harmonic analysis with the discrete Fourier transform. Proceedings of the IEEE*, ročník 66, č. 1 Leden 1978: s. 51–83 ISSN 0018-9219 doi:10.1109/PROC.1978.10837.
- [68] Goldstein, R. M.; Zebken, H. A.; Werner, C. L. *Satellite radar interferometry: Two-dimensional phase unwrapping. Radio Sci.*, ročník 23, č. 4 1988: str. 713720 doi:10.1029/RS023i004p00713.
- [69] Ghiglia, D. C.; Pritt, M. D. *Two-Dimensional Phase Unwrapping: Theory, Algorithms and Software*. New York: Wiley-Interscience, 1998.
- [70] Born, M.; Wolf, E. *Principles of Optics*. seventh expanded edition Edition. Cambridge university press, 2002, SBN-13: 978-0521642224.
- [71] Goodman, J. W. *Introduction to Fourier Optics. (3rd ed.)* Roberts & Company, 2005.
- [72] Thorlabs, Inc., www.thorlabs.de, [Online; 12. Května 2016].
- [73] TESCAN ORSAY HOLDING, a.s., <http://www.tescan.com/en/products/q-phase/q-phase>, [Online; 12. Května 2016].
- [74] Hitec RCD USA Inc., www.hitecrcd.com, [Online; 12. Května 2016].
- [75] HuiDa RC International Inc., www.chd.hk, [Online; 12. Května 2016].
- [76] SmarAct GmbH, www.smaract.de, [Online; 12. Května 2016].
- [77] Snail Instruments, www.snailshop.cz, [Online; 12. Května 2016].
- [78] RobotShop Inc., www.lynxmotion.com and www.robotshop.com, [Online; 12. Května 2016].
- [79] SKF CZ, a.s., <http://www.skf.com/cz/index.html>, [Online; 12. Května 2016].
- [80] Fercher, A.; Hitzenberger, C.; Sticker, M.; a kol. *A thermal light source technique for optical coherence tomography. Optics Communications*, ročník 185, č. 1–3 2000: s. 57 – 64 ISSN 0030-4018 doi:10.1016/S0030-4018(00)00986-X.
- [81] MICROSCOPYU, www.microscopyu.com/tutorials/flash/focusdrift/perfectfocus, [Online; 12. Května 2016].
- [82] Prior Scientific Instruments Ltd., www.prior-scientific.co.uk/Products/Focus-drives/Laser-AutoFocus.aspx, [Online; 12. Května 2016].
- [83] Motion X Corporation, www.motionxcorp.com/focustrac-laser-auto-focus-systems.html, [Online; 12. Května 2016].

- [84] Langehanenberg, P.; Ivanova, L.; Bernhardt, I.; a kol. *Automated three-dimensional tracking of living cells by digital holographic microscopy. Journal of biomedical optics*, ročník 14, č. 1 2009: s. 014018–014018 doi:10.1117/1.3080133.
- [85] Sun, Y.; Duthaler, S.; Nelson, B. J. *Autofocusing algorithm selection in computer microscopy. in 2005 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems* IEEE 2005 s. 70–76.
- [86] Toy, M. F.; Richard, S.; Kühn, J.; a kol. *Enhanced robustness digital holographic microscopy for demanding environment of space biology. Biomedical optics express*, ročník 3, č. 2 2012: s. 313–326 doi:10.1364/BOE.3.000313.
- [87] Langehanenberg, P.; Kemper, B.; Dirksen, D.; a kol. *Autofocusing in digital holographic phase contrast microscopy on pure phase objects for live cell imaging. Applied optics*, ročník 47, č. 19 2008: s. D176–D182 doi:10.1364/AO.47.00D176.

CURRICULUM VITAE

Osobní údaje

Jméno: Ing. Zbyněk Dostál
Trvalé bydliště: Pionýrů 1338, 564 01 Žamberk, Česká Republika
Datum narození: 16.5. 1985
E-mail: zbynek.dostal@ceitec.vutbr.cz
Národnost: Česká

Studium

2004 – 2007 Bakalářské studium, stud. program Strojírenství, Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Technická 2, Brno, ČR.
2007 – 2009 Magisterské studium, stud. program Přesná mechanika a optika, Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Technická 2, Brno, ČR.
od roku 2009 Doktorské studium, stud. program Fyzikální a materiálové inženýrství, Vysoké učení technické v Brně, Technická 2, Brno, ČR.

Odborné stáže

únor – duben 2014 Stáž na Universitě v St Andrews, School of Physics & Astronomy, u prof. Kishana Dholakii.

Přehled zaměstnání

od srpna 2011 Zaměstnán ve výzkumné skupině Experimentální biofotonika, STI – Středoevropský technologický institut VUT
od ledna 2012 Zaměstnán na Ústavu fyzikálního inženýrství, Fakulta strojního inženýrství, VUT

Členství ve spolcích

od roku 2010 Člen OSA Student chapter of Central European Institute of Technology-Brno University of Technology
od roku 2014 Člen České společnosti pro vědeckou kinematografii, Sekce aplikované optiky a mikroskopie

Pedagogické aktivity

- Výuka laboratoří z mechaniky, elektřiny a magnetismu, optiky, termodynamiky, kmitání a vlnění
- Přednášky a cvičení z biofotoniky
- Přednášky a cvičení z optického designu

- Přednášky z digitální holografické mikroskopie
- Vedení bakalářských a diplomových prací

Seznam vlastních publikací k tématu disertační práce

Odborné publikace

- Slabý, T.; Antoš, M.; Dostál, Z.; Kolman, P.; Chmelík, R. *Coherence-controlled holographic microscope*. In *Proceedings of SPIE, Volume 7746. Proceedings of SPIE*. SPIE, 2010. s. 77461R-1 (77461R-8 s.) ISBN: 9780819482365. ISSN: 0277-786X.
- Slabý, T.; Kolman, P.; Dostál, Z.; Antoš, M.; Lošťák, M.; Chmelík, R. *Off-axis setup taking full advantage of incoherent illumination in coherence-controlled holographic microscope*. *Optics Express*, 2013, roč. 21, č. 12, s. 14747-14762. ISSN: 1094-4087.
- Dostál, Z.; Slabý, T.; Kvasnica, L.; Lošťák, M.; Křížová, A.; Chmelík, R. *Automated alignment method for coherence-controlled holographic microscope*. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, roč. 20, č. 11, s. 111215-1 (111215-8 s.) ISSN: 1083-3668.

Patenty

- Chmelík, R.; Slabý, T.; Kolman, P.; Dostál, Z.; Antoš, M.; Vysoké učení technické v Brně: *Interferometrický systém s prostorovou nosnou frekvencí zobrazující v polychromatickém záření*.
 - český užitečný vzor č. 21593, udělen v roce 2011
 - český patent č. 302491, udělen v roce 2011
 - evropský patent EP 2378244 B1, udělen v roce 2012
 - patent USA US 8526003 B2, udělen v roce 2013
 - ruský patent EA 018804 B1, udělen v roce 2013
 - japonský patent JP 5510676 B2, udělen v roce 2014
 - čínský patent CN102279555B, udělen v roce 2016
- Chmelík, R.; Dostál, Z.; Kolman, P.; Slabý, T.; Lošťák, M.; Vysoké učení technické v Brně, TESCANA ORSAY HOLDING, a.s.: *Interferometrický systém s variabilní optikou pro nekoherentní zdroj záření a způsob naladění interferometrického systému*. český patent č. 305665, udělen v roce 2015

Seznam vlastních publikací

- Lošťák, M.; Kolman, P.; Dostál, Z.; Chmelík, R. *Diffuse light imaging with a coherence controlled holographic microscope*. In *Proceedings of SPIE, Volume 7746. Proceedings of SPIE*. SPIE, 2010. s. 77461N-1 (77461N-9 s.) ISBN: 9780819482365. ISSN: 0277-786X.

- Navrátil, P.; Marcián, P.; Cívín, A.; Dostál, Z. *Influence of stress waves to cracked railroad wheel*. In *Proceedings 49th International Scientific Conference, Experimental Stress Analysis 2011*. 1. Znojmo: Brno University of Technology, 2011. s. 259-266. ISBN: 978-80-214-4275-7.
- Chmelík, R.; Slabá, M.; Kollárová, V.; Slabý, T.; Lošťák, M.; Čolláková, J.; Dostál, Z. *The Role of Coherence in Image Formation in Holographic Microscopy*. *Progress in Optics*, 2014, roč. 59, č. 1, s. 267-336. ISSN: 0079-6638.
- Čolláková, J.; Křížová, A.; Dostál, Z.; Antoš, M.; Vašíček, D.; Chmelík, R. *Multi-modální holografický mikroskop - společný projekt VUT a TESCAN. Jemná mechanika a optika*, 2014, roč. 59, č. 6-7/ 2014, s. 160-162. ISSN: 0447-6441.
- Kollárová, V.; Lošťák, M.; Slabá, M.; Slabý, T.; Čolláková, J.; Dostál, Z.; Křížová, A.; Štrbková, L.; Chmelík, R. *Imaging of 2D objects through diffuse media by coherence controlled holographic microscope*. In *Digital Holography and Three-Dimensional Imaging*. Seattle, Washington United States: Optical Society of America, 2014. ISBN: 978-1-55752-308-2.
- Kollárová, V.; Čolláková, J.; Dostál, Z.; Veselý, P.; Chmelík, R. *Quantitative phase imaging through scattering media by means of coherence-controlled holographic microscope*. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, roč. 20, č. 11, s. 1112016-1 (111206-8 s.) ISSN: 1083-3668.
- Čolláková, J.; Křížová, A.; Kollárová, V.; Dostál, Z.; Slabá, M.; Veselý, P.; Chmelík, R. *Coherence-controlled holographic microscopy enabled recognition of necrosis as the mechanism of cancer cells death after exposure to cytopathic turbid emulsion*. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, roč. 20, č. 11, s. 111213-1 (111213-7 s.) ISSN: 1083-3668.
- Křížová, A.; Čolláková, J.; Dostál, Z.; Kvasnica, L.; Uhlířová, H.; Zikmund, T.; Veselý, P.; Chmelík, R. *Dynamic phase differences based on quantitative phase imaging for the objective evaluation of cell behavior*. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, roč. 20, č. 11, s. 111214 1 (111214-8 s.) ISSN: 1083-3668.
- Plöschner, M.; Kollárová, V.; Dostál, Z.; Nylk, J.; Barton-Owen, T.; Ferrier, D.; Chmelík, R.; Dholakia, K.; Čižmár, T. *Multimode fibre: Light-sheet microscopy at the tip of a needle*. *Scientific Reports*, 2015, roč. 5, č. 1, s. 1-7. ISSN: 2045-2322.
- Kollárová, V.; Čolláková, J.; Dostál, Z.; Slabý, T.; Veselý, P.; Chmelík, R. *Quantitative phase imaging through scattering media*. In *Quantitative Phase Imaging*. San Francisco, CA: Spie-int Soc Optical Engineering, 1000 20th st, PO BOX 10, Bellingham, WA 98227-0010 USA, 2015. s. 93360T-1 (93360T-8 s.) ISBN: 978-1-62841-426-4.

- Antoš, M.; Bouchal, P.; Dostál, Z.; Štrbková, L.; Kvasnica, L.; Kolman, P.; Chmelík, R. *Mikroskopie v Laboratoři experimentální biofotoniky. Jemná mechanika a optika*, 2016, roč. 61, č. 6, s. 135-139. ISSN: 0447-6441.